



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología Molecular

**DENDRÍMEROS DE ESTRUCTURA
CARBOSILANO. ESTUDIOS DE
BIOCOMPATIBILIDAD Y EFICACIA EN LA
PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA
INFECCIÓN POR EL VIH**

TESIS DOCTORAL

Louis Chonco Jiménez

Madrid, 2011

Dirigida por la Dra. :

Dña. María Ángeles Muñoz Fernández

Tutor :

Dña. María Ángeles Muñoz Fernández

Madrid, Marzo de 2.011

Dña. MARÍA ANGELES MUÑOZ FERNÁNDEZ, DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS,
DOCTORA EN PEDIATRÍA, JEFA ADJUNTA DEL LABORATORIO DE INMUNO-BIOLOGÍA
MOLECULAR DEL HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO “GREGORIO MARAÑÓN” DE
MADRID



CERTIFICA: Que la Memoria titulada

**“DENDRÍMEROS DE ESTRUCTURA CARBOSILANO.
ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD Y EFICACIA EN LA
PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR
EL VIH”,**

presentada por D. Louis Chonco Jiménez, ha sido realizada bajo mi
dirección.

Examinado dicho trabajo, doy mi conformidad para su presentación y
defensa como Tesis doctoral.

Y para que conste y obre a los efectos oportunos, firmo el presente
certificado en Madrid a

VºBº La directora

Cada vez es más habitual encontrar equipos multidisciplinares en los hospitales, donde los pacientes que acuden a terapia para tratar de mejorar o mantener su salud, se encuentran con un equipo formado por enfermeros, médicos, psicólogos, fisioterapeutas y terapeutas ocupacionales, el cual se encarga de realizar un plan de trabajo para llevar a cabo la recuperación de los pacientes combinando cada una de las disciplinas a las que pertenece cada miembro. Este trabajo es reflejo de este hecho innegable y representa el fruto del esfuerzo de un innovador equipo multidisciplinar formado por un grupo de médicos, biólogos, farmacéuticos, químicos y físicos de tres grupos de investigación con muy diferentes intereses científicos en un principio, pero unidos por este proyecto para la consecución de los objetivos del mismo: el grupo de Química de Dendrímeros para Aplicaciones Biomédicas (BIOINDEN) de la Universidad de Alcalá de Henares, el grupo de Biofísica de la Universidad de Lodz (Polonia) y el Grupo de Inmunobiología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid.

A mi madre

El camino científico recorrido hasta la elaboración de esta Memoria ha sido tan intenso como productivo. El gasto emocional, incalculable. Y no habría llegado hasta aquí sin el apoyo y los buenos consejos de mis familiares y amigos más queridos. A ti mamá, te lo debo todo. Estos últimos años he soñado con dedicarte este momento, con lágrimas en los ojos y una tierna sonrisa al mirar atrás. A ti Montse, te agradezco la agradable convivencia que nos hace afrontar el día a día con ilusión y confianza. Te quiero mucho. A mi abuela Teresa, tíos y primos de Villarrobledo que siempre se han interesado por mi labor científica, además de darme todo su afecto y comprensión. A la familia García Cañas (Os quiero de corazón y os agradezco la educación y cariño que siempre me habéis dado. Este trabajo lo empezaste tú, Pili. Vaya tarde la de aquel día, jeje). A Amparo, por ser tan auténtica y darme tan sabios consejos (reserva mesa en el muelle que esto hay que celebrarlo). A Inés, Yoli y Melqui (nlojōri liquë. Potöom a lo lö le motaerilä). A toda la familia Lambot y con especial cariño a Mr. Patrick a.k.a. Donpa a.k.a. *pure creativity* (excelentes dibujos del dendrímero, que grande eres!) por compartir tantos años como hermanos en la adversidad y en la felicidad. Y a la familia Ramos García, especialmente a mi dulce bella Alicia, gracias de corazón por quererme tanto cada día (ONE LOVE).

Especialmente agradezco a M^a Ángeles, mi directora de tesis y la persona más multidisciplinar, multiemprendedora y multitodo en general que he conocido. Gracias por darme la oportunidad de engancharme al campo de la investigación y por tu apoyo y orientación en las múltiples circunstancias vividas.

Gracias a todos los doctores y amigos que me han apoyado en los inicios de este trabajo y que ahora desarrollan su labor científica en excelentes laboratorios nacionales e internacionales: Jesús (gracias por enseñarme a ponerle pasión a la investigación y formarme en nanomedicina), Almunology, Claudia, Elena, Gero, Milagros, Nick (Big up doc!), Rosa (un abrazo maja!), Salva y especialmente a mi riquiña Alicia (siempre sabes lo que decir para animar a alguien. Que gran virtud). Gracias a Arantxa, Carmen y Cristina por haber compartido grandes anécdotas juntos. A Alberto (Ánimo “pájaro azul”), José Luis, Laura, Lola, Maribel, Pepa, Raquel y Susana por tantos buenos años trabajando codo con codo. A Chusa, Nati, Silvia, Teresa y Verónica por sus buenos dendri-consejos y su apoyo moral. A Mars&Rafa, por ser tan buenos amigos dentro y fuera del labo. A Irene, Javi, Josemari, Santi y Judith os agradezco las interesantes conversaciones que hemos mantenido. Al Dr. Nef y al sensei Micequilla por sus buenos

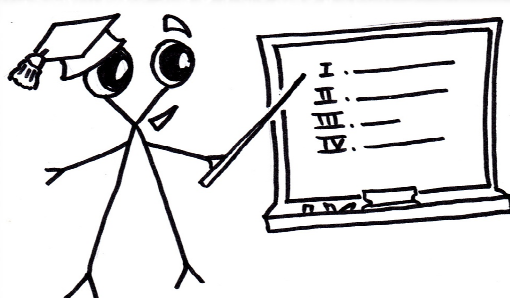
consejos basados en la experiencia (gracias por todo Ricardo y Miguel). A los más recientes como Enrique, Gloria, Irene, Marta y Sandra os deseo unos años muy productivos en el grupo. Agradezco a los integrantes del laboratorio de genómica Luis, Mabela y Rafa la ayuda recibida estos últimos años y a la gente que ha hecho realidad el primer biobanco europeo de muestras de VIH: Almudena, Coral, Isabel y Jorge (como os lo curráis colegas). A la doctora Gurbindo por el acceso a las muestras y su disponibilidad para cualquier consulta. A rafa a.k.a. *confocal guy*, por su empeño en mejorar mis experimentos con su experiencia en el microscopio.

Gracias al departamento de biofísica de la universidad de Lodz en Polonia y a todo el departamento de química inorgánica de la universidad de Alcalá de Henares, con el que empezamos esta apasionante aventura nanoscópica. Especialmente agradezco al actual grupo BIOINDEN, con Javi y Rafa a la cabeza (muchas gracias por todo vuestro apoyo. Sois unos cracks y la referencia carbosilánica internacional!!). Gracias a los creadores de los “dendris” con los que he trabajado estos últimos años: Paula (la que has liado con tu excelente síntesis, jaja), Beatriz (yang conseguido, taijitu completo) y Javi (gracias por las precisas respuestas químicas). Gracias a Edu (te paso el testigo), Sandra, Elena y Marta por la ayuda recibida.

Gracias a mis amigos de Villarrobledo, especialmente a Alfonso (gracias por tantos años de amistad) y a todo el CBV (este año nos metemos en playoff, burruecos!!). A Miguel (Waza ari Awasete Ippon) y Lobo por tantas risas acumuladas durante las noches de verano, a mis amigos de TJ Ray, Rubén a.k.a. Peter Duesberg, Salva y Suso os agradezco las experiencias vividas y las intensas conversaciones que mantenemos siempre desde la ciencia hasta la supervivencia.

A mis químicos Chemari, Rafaeliño, Santi, Toñín y Toño. Ya lo sabéis, pero ahora os lo digo por escrito: Gracias por ser mis amigos y compartir unos años tan maravillosos al igual que productivos durante la licenciatura (después de tantos *howis* y horas de biblioteca, lo hemos conseguido doctores!).

Y tras un buen evento o situación social indefinida, no podía faltar un III Tiempo: gracias a Batres, Billyboy, Chus, Danielo, Garzón, Gracia, Juanma, Pablo y Rafón por hacer posible una relación tan buena y saludable de amistad. Sois verdaderas montañas y os agradezco todo el apoyo durante estos años. Os quiero amigos.



ÍNDICE

ABREVIATURAS	25
SUMMARY	29
1. INTRODUCCIÓN	34-64
1.1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana	33
1.1.1. Ciclo de replicación del VIH y posibles dianas terapéuticas	35
1.1.2. Mecanismos de transmisión del VIH	37
1.1.3. Nanomedicina y el VIH	38
1.2. DENDRÍMEROS	42
1.2.1. Dendrimeros catiónicos y aniónico	45
1.2.2. Síntesis química de los dendrímeros	46
1.2.3. Propiedades físico-químicas de los dendrímeros	48
1.2.4. Dendrimeros de estructura carbosilano	49
1.2.5. Características de los dendrímeros en sistemas biológicos	51
1.2.6. Aplicaciones biomédicas de los dendrímeros	54
1.3 APLICACIONES BIOLÓGICAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS	58
1.3.1. Oligonucleótidos antisentido	59
1.3.2. Problemas de las terapias con oligonucleótidos antisentido	60
1.3.3. Comparación del mecanismo de silenciamiento génico de oligonucleótidos antisentido y ARN de interferencia	61
2. OBJETIVOS	67-68
3. MATERIALES Y METODOS	73-113
3.1. DENDRÍMEROS DE ESTRUCTURA CARBOSILANO	73
3.1.1. Síntesis y solubilidad de los dendrímeros de estructura carbosilano catiónicos	73
3.1.2. Síntesis y solubilidad de los dendrímeros de estructura carbosilano aniónicos	76
3.2. AGENTES DE TRANSFECCIÓN COMERCIALES	79
3.3. OLIGONUCLEOTIDOS	80
3.4. ESTUDIO DE LOS DENDRIPLEXES DEC+/ODN	81
3.4.1. Formación de los dendriplexes	82
3.4.2. Electroforesis	84
3.4.2.1. Dendriplex vs Albúmina	85
3.4.2.2. Dendriplex vs Nucleasas	85
3.4.3. Espectrofluorimetría	86
3.4.3.1. Estudio de las interacciones DEC+/ADN	87
3.4.3.1.1 Polarización de la fluorescencia	87
3.4.3.1.2 Ensayo de bromuro de etidio	87
3.4.3.2. Estudio de las interacciones DEC+/BSA	89

3.4.3.3. Análisis de Stern-Volmer	89
3.4.3.4. Análisis de Scatchard-Klotz	90
3.4.3.5. Análisis estadístico	91
3.4.4. Incubación de dendrímero y dendriplex con distintos cultivos primarios y líneas celulares establecidas	92
3.5. CÉLULAS	93
3.6. ESTUDIO DE LAS POBLACIONES CELULARES POR CITOMETRÍA DE FLUJO	95
3.6.1. Estudio de internalización del ODN en CMSP de neonatos y Adultos por citometría de flujo	96
3.6.2. Macrófagos y células dendríticas derivadas de monocito	96
3.7. MICROSCOPÍA CONFOCAL	97
3.8. VIABILIDAD CELULAR	98
3.8.1. Tinciones con azul tripán	99
3.8.2. Marcajes con Anexina-V-PE y 7-AAD	99
3.8.3. Marcaje con DAPI	100
3.8.4. Ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa	100
3.8.5. Ensayo de reducción de sales de tetrazolio	100
3.8.6. Ensayo de hemólisis	101
3.8.7. Ensayo linfoproliferativo	102
3.9. ENSAYOS DE INHIBICIÓN VIRAL	102
3.9.1. Preparación y utilización de virus	102
3.9.2. Reactivos utilizados	104
3.9.3. Infección <i>in vitro</i> de las diferentes poblaciones celulares	105
3.9.3.1. Pre- y post- tratamiento de células mononucleares de sangre periférica	105
3.9.3.2. Inhibición de la entrada en células dendríticas y macrófagos	106
3.9.4. Inhibición de la infección viral en células HEC-1A	106
3.9.5. Estudio de la inactivación de VIH y VIS por el DEC- 2G-S16	106
3.10. ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE LA BARRERA EPITELIAL VAGINAL	107
3.10.1. Formación de la monocapa de HEC-1A	107
3.10.2. Inhibición de la transmisión viral	108
3.11. BIODISTRIBUCIÓN DEL DENDRIPLEX EN RATONES	109
3.12. ESTUDIO GENÉTICO POR <i>MICROARRAYS</i> DE LOS DENDRÍMEROS CARBOSILANO ANIÓNICOS	111
3.13. ENSAYO <i>IN VIVO</i> DE 2G-S16 EN CONEJOS HEMBRA BLANCOS DE NUEVA ZELANDA	112

4. RESULTADOS 117-178

I. DENDRÍMEROS DE ESTRUCTURA CARBOSILANO CATIÓNICOS

4.1. FORMACIÓN DEL DENDRIPLEX DEC+/ÁCIDOS NUCLEICOS	117
4.2. ESTABILIDAD DE LOS DEC+ EN SOLUCIÓN ACUOSA	120
4.3. ESTABILIDAD DE LOS DEC+ EN FUNCION DEL pH	122

4.4. PROTECCIÓN DE LOS DEC+ A LOS ÁCIDOS NUCLEICOS FRENTE A LA DEGRADACIÓN POR LAS NUCLEASAS	123
4.5. INTERACCIÓN DE DENDRÍMERO Y DENDRIPLEX CON PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	124
4.5.1. Estabilidad del dendriplex en presencia de albúmina	124
4.5.2. Estabilidad del dendriplex en medio de cultivo completo	126
4.5.3. Estabilidad del dendriplex en presencia de un detergente aniónico	127
4.5.4. Estabilidad del dendriplex en presencia de suero humano AB	128
4.6. ESTUDIOS DE ESPECTROFLUORIMETRÍA	130
4.6.1. Estudio de la interacción entre los DEC+ y ODN	130
4.6.1.1. Dendriplex DEC+/ODN	130
4.6.1.2. Interacción DEC+/ADN _{TT}	131
4.6.2. Estudio de la interacción de BSA y ODN	133
4.6.3. Estudio de la interacción de DEC+ y BSA	133
4.6.4. Estudio de la interacción DEC+/ODN + BSA y BSA/ODN + DEC+	136
4.6.5. Estudio de la interacción de DEC+ y ANS	137
4.7. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR DE LOS DENDRÍMEROS CATIÓNICOS	138
4.8. ESTUDIOS DE TRANSFECCIÓN	144
4.8.1. Internalización del ODN en CMSP	144
4.8.2. Internalización del ODN en monocitos	147
4.8.3. Internalización del dendriplex en linfocitos, monocitos y células dendríticas	148
4.9. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL VIH	151
4.9.1. Estudio del efecto de dendriplexes en MT-2 infectadas por VIH	151
4.9.2. Estudio del efecto de los dendriplexes en CMSP infectadas por VIH	152
4.10. BIODISTRIBUCIÓN DE DENDRIPLEXES	154

II. DENDRÍMEROS DE ESTRUCTURA CARBOSILANO ANIÓNICOS

4.11. VIABILIDAD CELULAR DE LOS DENDRÍMEROS ANIÓNICOS	155
4.12. EFICACIA ANTI-VIH DE LOS DEC- 2G-C16 Y 2G-S16	159
4.12.1. Inhibición de la infección viral en células HEC-1A	159
4.12.2. Inhibición de la internalización viral en células HEC-1A	161
4.12.3. Inhibición de la infección viral en CMSP	162
4.13. ACTIVIDAD PROFILÁCTICA Y TERAPÉUTICA DEL DEC- 2G-S16	163
4.14. INACTIVACIÓN DEL VIH Y VIS POR EL DENDRÍMERO ANIÓNICO 2G-S16	164
4.15. ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN VIRAL DEL DEC- 2G-S16	165
4.15.1. Interacción del DEC- 2G-S16 y el VIH en células vaginales	165
4.15.2. Transmisión viral a través de una monocapa de HEC-1A	166
4.15.2.1. Formación de la monocapa	166
4.15.2.2. Inhibición de la transmisión viral	169
4.15.3. Interacción 2G-S16/VIH en macrófagos y células dendríticas	
4.16. ESTUDIO GENÉTICO DE LA INTERACCIÓN DEL DEC+ 2G-S16 Y CÉLULAS VAGINALES	173
4.17. ENSAYO <i>IN VIVO</i> DEL DENDRÍMERO ANIÓNICO 2G-S16	177

5. DISCUSIÓN	183-204
6. CONCLUSIONS	209-210
7. ANEXOS	215-277

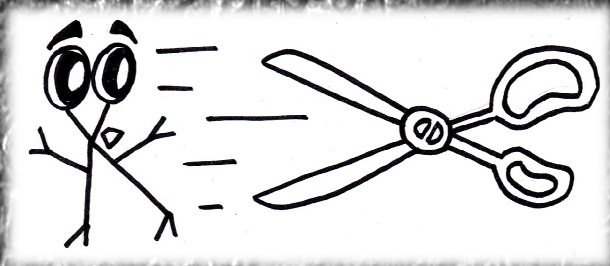
Publicaciones

• Novel water-soluble carbosilane dendrimers: synthesis and biocompatibility	215
• Comparative uptake of phosphorothioate oligonucleotides by peripheral blood mononuclear cells from newborns and adults	225
• Water-soluble carbosilane dendrimers: synthesis biocompatibility and complexation with oligonucleotides; evaluation for medical applications.	235
• Water-soluble carbosilane dendrimers protect phosphorothioate oligonucleotides from binding to serum proteins	249
• Analysis of interaction between dendriplexes and bovine serum albumin	257
• Binding properties of water-soluble carbosilane dendrimers	261
• Gene therapy in HIV-infected cells to decrease viral impact by using an alternative delivery method	269
• <i>Anionic carbosilane dendrimers: synthesis and antiviral activity. En preparación</i>	279
• <i>HIV sexual transmission blockade based on current carbosilane dendrimer nanotechnology. En preparación</i>	279

Patentes

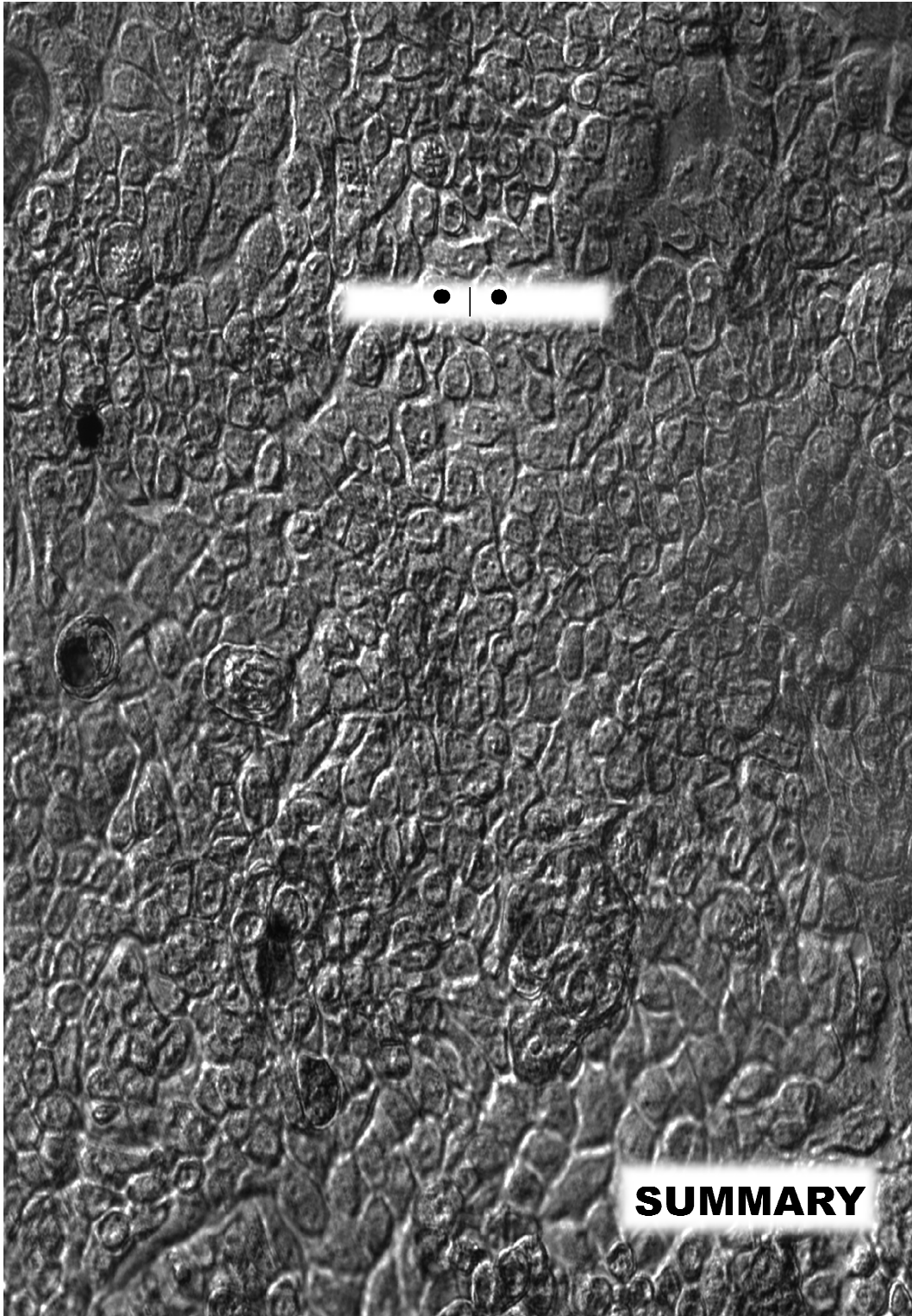
• NUEVOS DENDRÍMEROS CARBOSILANOS, SU PREPARACIÓN Y SUS USOS.	279
• DENDRÍMEROS CARBOSILANOS Y SU USO COMO ANTIVIRALES	279
• DENDRÍMEROS CARBOSILANOS CON UN NÚCLEO POLIFENÓLICO Y SU USO COMO ANTIVIRALES	279

8. BIBLIOGRAFIA	283-303
-----------------	---------



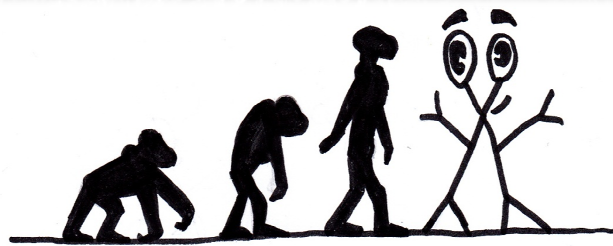
ABREVIATURAS

7-AAD	7-aminoactinomicina-D	MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	NIH	<i>National institutes of Health</i>
BE	Bromuro de etidio	ODN	Oligonucleótidos
BrdU	Bromodeoxiuridina	PAMAM	Dendrímeros tipo poliamidoaminados
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
c.p.m.	Cuentas por minuto	PE	Ficoeritrina
CC	Condiciones de cultivo	PEI	Dendrímeros tipo polietilenimina
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica	PFA	Paraformalehido
D.O.	Densidad óptica	PHA	<i>Phytohaemagglutinin</i>
DEC	Dendrímeros de estructura carbosilano	PLL	Poli-L-lisina
DMSO	Dimetil sulfóxido	PPI	Dendrímeros tipo polipropilenimina
ej.	ejemplo	ppm	Partes por millón
Fig.	Figura	RMN-¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
FITC	Fluoresceína 5-isotiocianato	ROI	<i>Region Of Interest</i>
FW	Tamaño celular (citometría)	SD	Complejidad celular (citometría)
G4	PAMAM de 4ª generación	SF	Superfect
h	Horas	SFT	Suero Fetal de Ternera
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>	siRNA	<i>small interference RNA</i>
IL	Interleucina	TAE	Tris acético EDTA
LDH	Lactato deshidrogenasa	Trp	Triptófano
MCC	Medio de cultivo completo	u.r.	Unidades relativas
min	Minutos	UI	Unidades internacionales
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>		



Nanotechnology is a scientific discipline that studies the application of nanoscopic displays to different fields: Electronics, Chemistry but also Biomedicine. Dendrimers are nanoscopic polymers that have deserved a great attention in the last years due to their potential application, including light harvesting and energy transfer, nanoscale catalysis, chemical sensors, unimolecular micelles, enzyme mimics, encapsulation of guest molecules, molecular recognition, diagnostic agents, microbicides and gene and drug delivery. On the other hand, the use of oligonucleotides is being evaluated in distinct biomedical areas. Antisense oligonucleotides are short sequences of 15-30 nucleotides, DNA or analogues synthetic complementary (or antisense) to a given target sequence; they are designed to interfere with a biological event such as transcription, translation, or splicing. One of the main existing problems of the therapy with antisense oligonucleotides is to achieve appropriate therapeutic levels. It is necessary to administrate huge doses to achieve the desired biological effect, given that oligonucleotides present a high affinity to bind plasmatic proteins such as albumin. It is thought that the use of a carrier could prevent the union to plasmatic proteins and would translate into higher levels of active oligonucleotide, extending its plasmatic life and decreasing its toxicity.

In this work, carbosilane dendrimers with peripheral cationic and anionic groups are studied in two HIV treatment biomedical applications; cationic carbosilane dendrimers have been evaluated for biocompatibility and binding to DNA leading dendriplex formation. It was studied their potential use as carriers for oligonucleotides along with the ability to protect them from binding to plasmatic proteins. These dendrimers are aimed to increase the plasmatic life of oligonucleotides, their bioavailability and to diminish the dose required to achieve the biological effect. Besides, supported evidence on the potential inhibition of the replicative cycle of HIV by these dendriplexes is shown. Anionic carbosilane dendrimers have been evaluated as antiviral molecules in HIV sexual transmission. These studies of biocompatibility and efficacy were performed on vaginal cell lines and primary cell cultures as peripheral blood mononuclear cells, macrophages and dendritic cells, in order to evaluate anionic carbosilane dendrimers as potential microbicides against HIV infection. First pre-clinical *in vivo* assay in rabbits is presented. This work establishes the bases for the evaluation of future biomedical applications with these dendrimers.



1. INTRODUCCIÓN

La investigación y utilización de nuevos materiales y dispositivos a una escala menor que un micrómetro, es decir, a nivel de átomos y moléculas, representa un área de la Ciencia llamada Nanotecnología. Richard Feynman, premio Nobel de Física en 1965, es considerado el padre de la "nanociencia". En 1959, propuso fabricar productos en base a un reordenamiento de átomos y moléculas. En la década de los 80, Kim Eric Drexler desarrolló el concepto de Nanotecnología, siendo hoy en día una de las ramas de la Ciencia con más capacidad de revolucionar la vida humana en todas sus vertientes. Si alcanzara sus potencialidades, su impacto desencadenaría una segunda revolución industrial, unas prestaciones en la medicina absolutamente revolucionarias (ej. predicción y tratamiento del cáncer). Aunque las primeras aplicaciones de la Nanotecnología se centraron en los campos de la Informática y de la Electrónica, pronto se abrió camino en el mundo de las Ciencias de la Salud. La Nanotecnología aplicada a la Medicina recibe el nombre de Nanomedicina y es una de las áreas que más puede contribuir al avance sostenible de los países en desarrollo, proporcionando nuevos métodos de diagnóstico y detección de enfermedades, mejores sistemas para la administración de fármacos y herramientas para la monitorización de algunos parámetros biológicos. La Nanomedicina es la base de esta Memoria. A continuación, se recogen los estudios realizados con nuevos polímeros de tamaño nanoscópico basados en la química del silicio con potencial aplicación biomédica en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

1.1. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

La pandemia global del VIH/SIDA es la mayor amenaza a la salud mundial con la que probablemente nos enfrentemos en nuestra generación. En 2008, el número de personas que vivían con el VIH en todo el mundo continuó aumentando hasta alcanzar una cifra estimada de 33,4 millones. El incremento constante en la población de personas que vive con el VIH refleja los efectos combinados de las tasas persistentemente altas de nuevas infecciones por el VIH y los efectos beneficiosos de la terapia antirretroviral [1].

Como otros agentes causantes de enfermedades infecciosas emergentes, el VIH pasó a los seres humanos por zoonosis. La aparición del sida y la identificación del VIH estimularon investigaciones que han permitido determinar que las variantes del VIH forman parte de un amplio grupo de *Lentivirus* que constituyen un grupo dentro de la familia *Retroviridae* [2]. Los virus de este grupo poseen propiedades morfológicas y biológicas comunes. La característica principal de los lentivirus a nivel clínico consiste en un período de incubación prolongado que desemboca en enfermedad después de varios años [3]. Existen dos tipos del VIH, llamados VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es más virulento e infeccioso que el VIH-2 y el causante de la mayoría de infecciones por VIH en el mundo [4]. El VIH-2 es menos contagioso y por ello se encuentra confinado casi exclusivamente a los países de África occidental [5]. Las cepas del VIH-1 son muy parecidas a las del virus de la inmunodeficiencia simia (VIS_{cpz}) del chimpancé, con una homología de secuencias de alrededor del 84 %; mientras que el VIH-2 está emparentado con el VIS_{sm} del *Sooti mangabey* y el VIS_{mac} del Macaco, con homologías del 82-89 % y 82-86 % respectivamente. [6]. A diferencia del VIH, el virus de los primates no causa inmunodeficiencia en los organismos que lo hospedan, salvo en el caso del salto de una especie a otra.

El VIH comparte con los retrovirus las características esenciales de esa familia. El virión contiene información genética bajo la forma de ácido ribonucleico (ARN), protegido por una envoltura de membrana. Los retrovirus insertan su información genética en las células hospedadoras por acción de la transcriptasa inversa [7]. Un virión del VIH tiene una forma aproximadamente esférica con un diámetro de 80-100 nm (Fig. 1A). Está constituido por tres capas y la exterior es una bicapa lipídica. Posee 72 prolongaciones formadas por las glicoproteínas gp120 y gp41 que actúan en el momento de la unión del virus a la célula hospedadora. La capa intermedia está constituida por la nucleocápside icosaédrica y la capa interior tiene forma de un cono truncado. La cadena genética del VIH está constituida por un ARN de cadena simple compuesto por dos filamentos idénticos. El ARN contiene varios genes, cada uno de los cuales codifica las diversas proteínas que el VIH necesita para replicarse [7]. El genoma del VIH-1 se describe en la figura 1B.

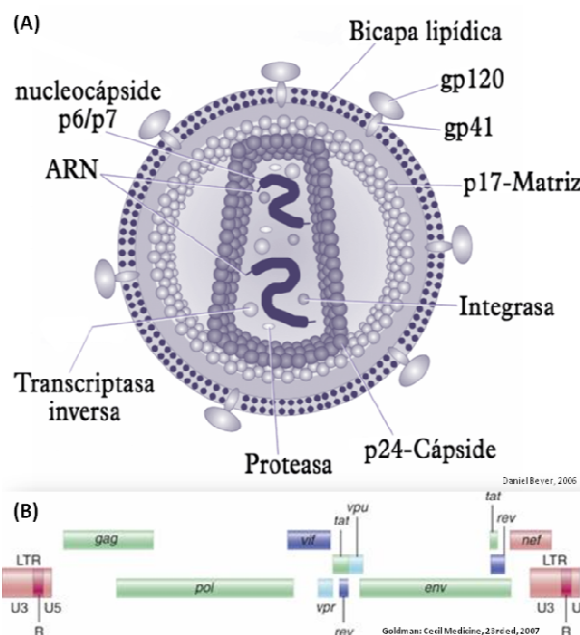


Fig. 1 Estructura y organización genómica del VIH. (A) Representación de las proteínas y zonas más relevantes del virión del VIH. (B) Genoma del VIH-1 de 9.2 Kb que contiene genes que codifican las proteínas enzimáticas y estructurales (gag, pol y env) halladas en todos los retrovirus competentes a la replicación, además de otros genes que codifican funciones virales únicas de esta familia de virus. LTR = repetición terminal prolongada.

1.1.1. Ciclo de replicación del VIH y posibles dianas terapéuticas

Las células que el VIH infecta son esencialmente los linfocitos T CD4+, pero también en menor medida los monocitos/macrófagos, las células dendríticas, las células de Langerhans y las células de microglía del cerebro. La replicación del VIH tiene lugar en tejidos diversos (de ganglios linfáticos, intestino, cerebro, timo, etc.). Los órganos linfoides, sobre todo los ganglios linfáticos, constituyen la principal sede de su replicación. El virus está presente en numerosos líquidos del organismo, en particular la sangre y las secreciones genitales. El proceso de replicación del VIH y sus posibles dianas terapéuticas se representan en la figura 2.

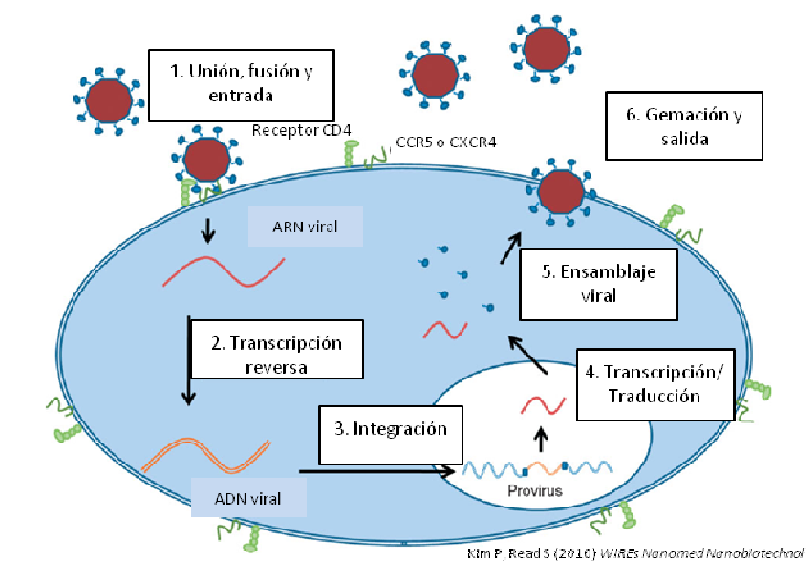


Fig. 2 Ciclo del VIH y dianas terapéuticas. 1 La entrada viral requiere la unión de gp120 al receptor celular CD4 y a un co-receptor (CCR5 o CXCR4). La unión al co-receptor origina cambios en la gp120 y en el péptido transmembrana gp41 dando lugar a la fusión de la membrana. Los inhibidores de CCR5 como el maraviroc previenen la unión viral a este co-receptor. Los inhibidores de fusión como enfuvirtide se unen a gp41 y previenen los cambios conformacionales necesarios para la fusión viral con la célula. 2 Dentro del compartimento citoplasmático, el núcleo viral internalizado y la enzima viral retrotranscriptasa (RT) copia el ARN viral en una doble hebra de ADN, la cual es transportada al interior del núcleo. Inhibidores de la RT análogos y no análogos de nucleósido (*NRTIs* y *NNRTIs*) como tenofovir o efavirenz inhiben este proceso. 3 Dentro del núcleo, la integrasa viral incorpora el ADN viral en el genoma celular, una etapa bloqueada por inhibidores de la integrasa como raltegravir. 4 El ADN proviral integrado es transcrito para generar un ARN viral completo y múltiples secuencias de ARNm que son traducidos a proteínas (ej. los precursores de Gag y Gag-Pol) por la maquinaria celular. 5 Las proteínas virales y el ARN viral son transportados cerca de la membrana plasmática donde son ensamblados con un número de factores celulares de la célula huésped en el interior de la partícula viral. 6 La gemación y salida de las partículas virales ocurre simultáneamente con la rotura de los precursores de Gag y Gag-Pol por la proteasa viral, dando lugar a un virión maduro. Inhibidores de la proteasa como lopinavir bloquean la etapa de rotura y previenen la formación de viriones maduros.

Aunque los tratamientos actuales son efectivos suprimiendo el virus en infecciones crónicas y previniendo la progresión de la infección por VIH a SIDA, los intentos de curación han fracasado [8]. A pesar de que las modalidades de prevención actuales como los microbicidas y las vacunas han mostrado recientemente potencial reducción en ensayos clínicos [9, 10], con la excepción de la circuncisión masculina [11], estos tratamientos no están disponibles para un elevado número de personas. La profilaxis pre-exposición (*PrEP*) aunque prometedora, todavía se encuentra bajo ensayos clínicos de eficacia [8]. Se ha propuesto una evaluación universal y un modelo de tratamiento como medidas alternativas para el fin de la pandemia [12]. Desde que la

eficiencia de la transmisión viral es proporcional a la carga viral en el individuo transmisor [13], conceptualmente, la pandemia puede disminuir tratando a los individuos infectados [14]. La eficacia de esta estrategia aún debe ser confirmada en la población.

En la última década se ha mejorado drásticamente la terapia antirretroviral (ARV). Actualmente existen alrededor de 30 agentes ARV utilizados solos o en combinación, clasificados por su mecanismo de acción. Los distintos fármacos actúan de forma específica en diversas etapas del ciclo de replicación del virus: en su unión y fusión al receptor CD4 de los linfocitos T, en la transcripción reversa del ARN viral o en la integración del ADN viral en el genoma de la célula huésped (Fig. 2). Por el contrario, los efectos adversos que presentan estos fármacos en el tratamiento crónico son todavía un grave problema: acidosis láctica, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad, lipodistrofia, hiperglicemia y resistencia a la insulina, enfermedades coronarias, etc. [15].

1.1.2. Mecanismos de transmisión del VIH

El VIH sólo se puede transmitir a través del contacto entre fluidos corporales que poseen una alta concentración viral. El virus no se transmite de manera casual y de acuerdo con los centros de control y prevención de enfermedades en Estados Unidos, no se han encontrado casos en que abrazos, besos secos o saludos con las manos hayan sido causantes de infección [16]. Las tres principales formas de transmisión son: **sexual**, la transmisión se produce por el contacto de secreciones infectadas con la mucosa genital, rectal u oral de la otra persona [17]; **Parenteral (sanguínea)**, es una forma de transmisión a través de jeringuillas contaminadas que se da por la utilización de drogas intravenosas o a través de los servicios sanitarios, como ha ocurrido a veces en países carentes de unas mínimas medidas de higiene; también en personas, como hemofílicos, que han recibido una transfusión de sangre contaminada o productos contaminados derivados de la sangre y en menor grado, trabajadores de salud que se exponen a la infección en un accidente de trabajo como puede ocurrir si una herida entra en contacto con sangre contaminada; también durante la realización de *piercings*, tatuajes y

escarificaciones [18]; **vertical (de madre a hijo)**, la transmisión puede ocurrir durante el embarazo, en el parto o durante el período de lactancia. En países desarrollados la transmisión vertical del VIH se encuentra controlada ya que existen protocolos estandarizados para proporcionar a la mujer embarazada un tratamiento personalizado acorde a su clínica, CD4 y carga viral [19].

1.1.3. Nanomedicina y el VIH

El desarrollo de nuevos nanomateriales biocompatibles se ha convertido en un importante objetivo de las compañías dedicadas a la Biotecnología. Ejemplos de los nanomateriales más utilizados en Medicina se describen en la figura 3 y tabla 1.

Las innovaciones en nanotecnología están teniendo un relevante impacto en la investigación del VIH/SIDA. En el tratamiento de la enfermedad, sistemas de liberación basados en nanopartículas se están adaptando para modular la liberación del fármaco o ácido nucleico, reducir la toxicidad asociada a la droga, proteger al fármaco del metabolismo celular y dirigirlo hasta células, tejidos o compartimentos específicos [20-23]. Desde que en 1992 Phillips y Tsoukas publicaron la encapsulación de AZT en un vehículo liposomal, evitando así la toxicidad hematopoyética en ratones y aumentando la actividad del fármaco frente al retrovirus de la leucemia murina LP-BM5 [24], se han desarrollado diferentes vehículos de transporte para reducir la toxicidad y mejorar la biodisponibilidad de los fármacos [25]. Un ejemplo del control de liberación del fármaco dependiente del pH se obtuvo por formación de un complejo lipídico con indinavir (IDV) y tenofovir [26]. Un estudio previo con este complejo lipídico en macacos infectados con el VIH-S mostró una localización en los nódulos periféricos y viscerales de 13 veces superior a la observada en plasma [27]. En terapia génica, el desarrollo de vectores no virales como los polímeros catiónicos está en continua evolución, ya que determinados polímeros pueden condensar el ADN de forma efectiva y se utilizan como sistemas de transporte de ADN [28]. Además, la biodistribución de los complejos formados por polímero y ADN es de fácil seguimiento en una población celular determinada comparada con el complejo liposoma y ADN [29].

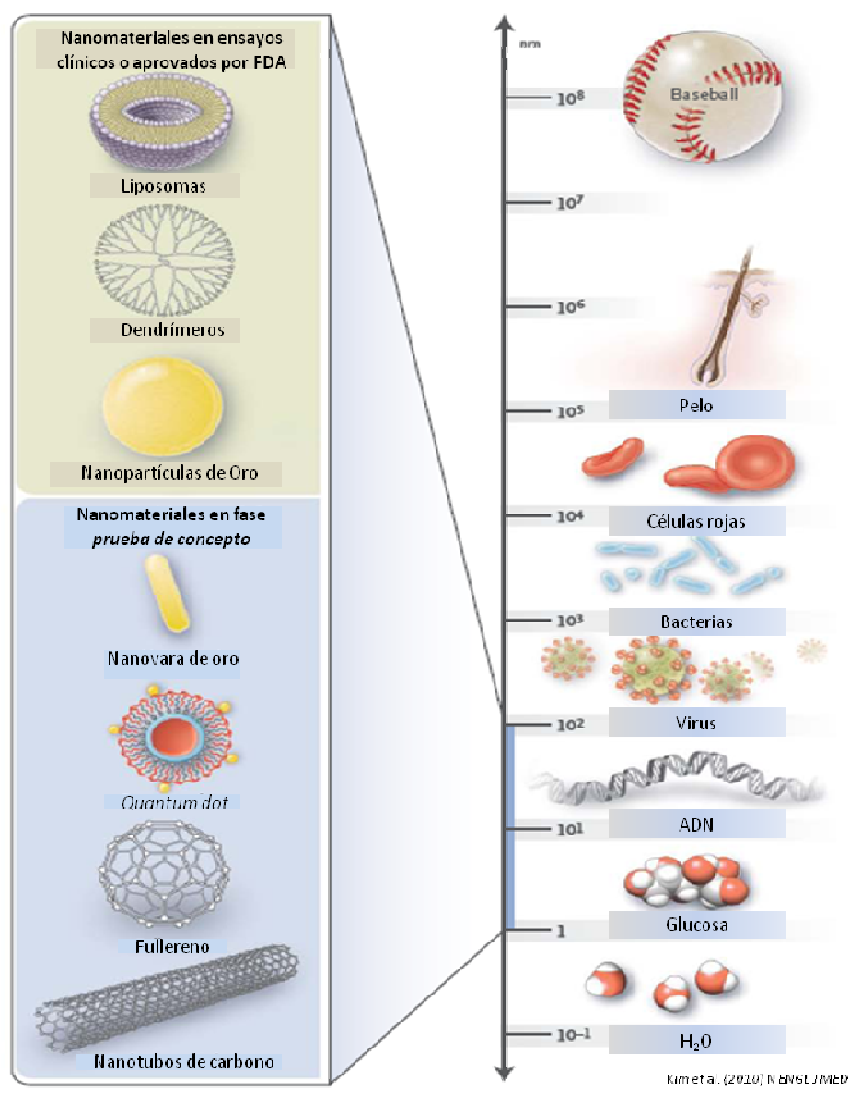


Fig. 3 Nanomateriales utilizados en Medicina. Diversos nanomateriales están siendo estudiados en ensayos clínicos o han sido aprobados por la agencia de fármacos y alimentos de EE.UU (FDA) para su uso en humanos; otros se encuentran en fase *prueba de concepto* en los laboratorios de investigación. Liposomas que contienen moléculas anfifílicas, que contienen grupos hidrofílicos e hidrofóbicos que se acoplan en disolución. Nanopolímeros esféricos llamados dendrímeros que contienen grupos funcionales en la periferia. Nanopartículas de oro que son normalmente recubiertas con fármacos, oligonucleótidos o proteínas. *Quantum dots* o puntos cuánticos, estructuras semiconductoras con gran aplicación en contraste de imágenes. Fullerenos, llamados *buckyballs* por su parecido con la cúpula geodésica diseñada por Buckminster Fuller y nanotubos de carbono formados sólo por uniones carbono-carbono. Estas estructuras reciben el nombre en relación al número de átomos de carbono que la molécula contiene (ej. Fullereno C60 contiene 60 átomos de carbono).

Tabla 1. Ejemplos de nanomateriales aptos para uso clínico.

Nanomateriales	Nombre	Aplicación	Diana	Efectos adversos	Compañía	Estado actual
Metálicos						
Óxido de hierro	Feridex	Contraste IRM*	Hígado	Dolor de espalda, vasodilatación	Bayer Schering	Aprobado por FDA
	Resovist	Contraste IRM*	Hígado	Ninguno	Bayer Schering	Aprobado por FDA
	Combidex	Contraste IRM*	Nódulos linfáticos	Ninguno	Advanced Magnetics	Ensayo clínico fase III
	NanoTherm	Terapia cancerígena	Múltiples	Retención urinaria aguda	MagForce	Ensayo clínico fase III
Oro	Verigene	Diagnóstico <i>in vitro</i>	Genética	No aplicable	Nanosphere	Aprobado por FDA
	Aurimmune	Terapia cancerígena	Múltiples	Fiebre	Cytimmune Sciences	Ensayo clínico fase II
Nanoconcha	Auroshell	Terapia cancerígena	Cabeza y cuello	En investigación	Nanospectra Biosciences	Ensayo clínico fase III
Semiconductores						
Quantum dot	Qdots, Evtags, semiconductor nanocrystals	Contraste de fluorescencia, diagnóstico <i>in vitro</i>	Tumores, células, tejidos y detectores moleculares	No aplicables	Life Technologies, eBioscience, Nanoco, CrystalPlex, Cytodiagnosics	Sólo usado en investigación
Orgánicos						
Proteína	Abraxane	Terapia cancerígena	Senos	Citopenia	Abraxis Bioscience	Aprobado por FDA
Liposoma	Doxil/Caelyx	Terapia cancerígena	Múltiples	Síndrome mano-pie, estomatitis	Ortho Biotech	Aprobado por FDA
Polímero	Oncaspar	Terapia cancerígena	Leucemia linfoblástica aguda	Urticaria, efluorescencia	Rhône-Poulenc Rorer	Aprobado por FDA
	CALAA-01	Terapia cancerígena	Múltiples	Toxicidad renal moderada	Calando	Ensayo clínico fase II
Dendrímero	Vivagel	Microbicida	Cervicovaginal	Dolor abdominal, disuria	Starpharma	Ensayo clínico fase II
Micela	Genexol-PM	Terapia cancerígena	Múltiples	Neuropatía, neutropenia	Samyang	Para ensayo clínico fase IV

* IRM: Imagen de Resonancia Magnética

Kim et al. (2010) N ENGL J MED

En resumen, la utilización de nanopartículas como los dendrímeros, las micelas poliméricas, los liposomas o sistemas de nanosuspensión son algunos ejemplos de dispositivos de liberación de fármacos con potencial uso en el tratamiento de la infección por el VIH [25].

En la prevención de la infección por el VIH no se ha obtenido hasta la fecha una vacuna segura y efectiva, por lo que otras aproximaciones para prevenir la transmisión del VIH están bajo estudio [25]. De las nuevas infecciones que se producen, un 95 % se concentra en África y en Asia y un 80 % del total de personas con VIH viven en estos continentes [30]. Desde hace varios años asistimos a la progresiva feminización de la

pandemia y cerca de la mitad de los individuos que viven con el VIH son mujeres, las cuales han adquirido el virus principalmente por transmisión heterosexual [31]. En este contexto, los microbicidas representan un capítulo fundamental de una respuesta integral al VIH/ SIDA.

El objetivo de los microbicidas es lograr reducir de manera significativa la infección por el VIH durante las relaciones sexuales y para poder cumplirlo un microbicida deberá ser seguro y eficaz, además de accesible a todas aquellas personas que lo necesiten. Se están investigando microbicidas vaginales y rectales, focalizando la acción antiviral en diferentes regiones del VIH [17]. Lo que diferencia los microbicidas vaginales de todas las otras herramientas de prevención actualmente en desarrollo es que están pensados para responder a las necesidades específicas de las mujeres. Desde mediados de los noventa, se investiga en microbicidas y en el año 2007 llegaron los primeros resultados de ensayos de eficacia (Fase III, la última etapa antes de su posible comercialización) de microbicidas llamados de primera generación [17]. Los microbicidas de primera generación se caracterizan por ser efectivos frente a otras enfermedades de transmisión sexual (ETS) o prevenir embarazos no deseados, pueden administrarse momentos antes del coito con un aplicador o utilizarse dispositivos como anillos vaginales o micro esponjas para su efecto prolongado, no actúan sobre el VIH de forma específica y no plantean problemas ante la posible aparición de resistencias a los ARV. Los resultados no fueron muy alentadores dado que los dos productos en estudio (Carraguard y Sulfato de Celulosa) no mostraron una protección suficiente ante el VIH [32]. Los llamados microbicidas de segunda generación están basados en ARV y se encuentran en ensayos clínicos de seguridad (Fase I/II). Se caracterizan por ser sólo efectivos ante el VIH y por tener efectos de larga duración (no se tienen que aplicar en cada relación sexual), pero la posible aparición de resistencias a los ARV es un aspecto que debe ser investigado. El reciente desarrollo de un modelo de macaco con dosis repetitivas del virus de la inmunodeficiencia en humano/simio (VIHS) puede suponer un buen modelo biológico para el estudio de potenciales microbicidas de segunda generación como el tenofovir gel [33]. Actualmente, existen alrededor de 50 moléculas en desarrollo como posibles microbicidas. Una lista completa se puede obtener en la

web Global Advocacy for HIV Prevention (www.avac.org). Aunque diferentes moléculas con potencial microbicida no han demostrado una reducción significativa de la adquisición del VIH en ensayos clínicos [34-37], incluso mostrando a veces resultados con importantes efectos adversos [38], un dendrímero aniónico basado en 32 grupos naftaleno sulfonato en la periferia (SPL7013) ha demostrado una inhibición significativa en la infección por VIH y VHS [39]. SPL7013 es activo frente a un rango amplio de subtipos de VIH-1 y VHS y actúa interfiriendo en la adhesión del virus a la célula diana. Este dendrímero se ha formulado en un gel de carbopol (mezcla de resinas solubles en agua) y se encuentra en ensayos clínicos de seguridad y eficacia bajo el nombre de VivaGel™. La combinación de diversas herramientas de prevención como los microbicidas junto con el uso del preservativo podría lograr el control de la infección por el VIH.

1.2. DENDRÍMEROS

Los dendrímeros son polímeros químicos versátiles, con forma bien definida, tamaño nanoscópico y con propiedades físico-químicas que recuerdan a las de las biomoléculas (Fig. 4).

El término dendrímero procede del griego *dendrón* que significa árbol o rama y *mero* que significa segmento [40]. Otro nombre que reciben los dendrímeros es el de “arbores” por su semejanza con las raíces de los árboles [41].

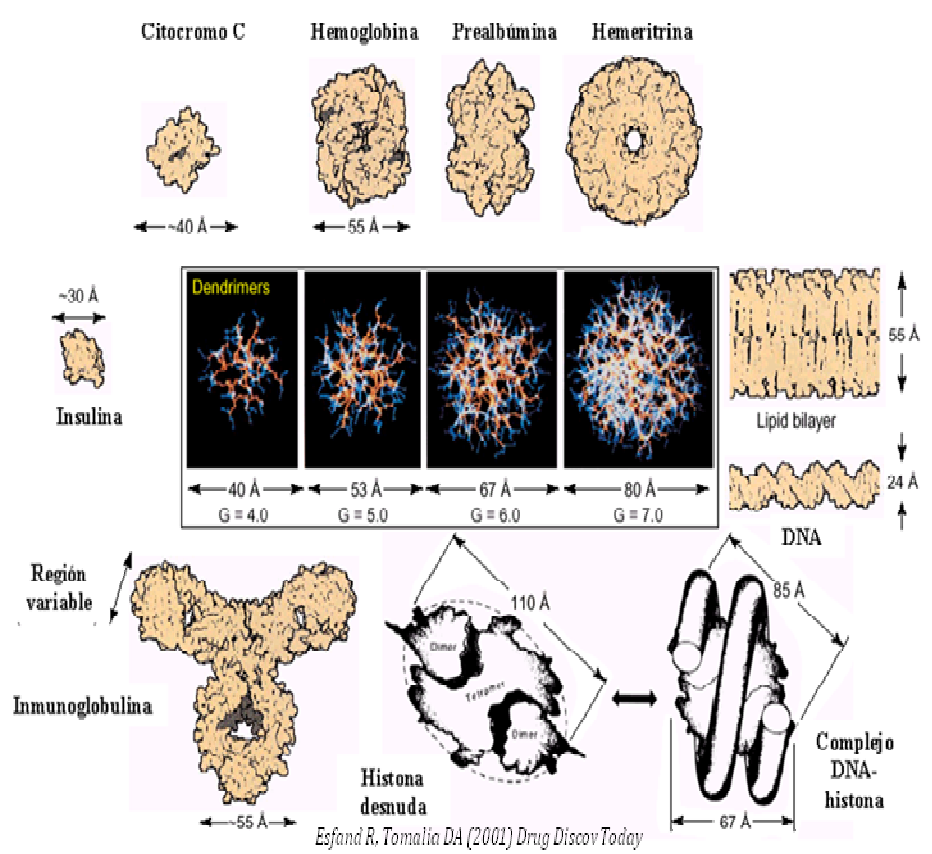


Fig. 4 Comparación del tamaño de diferentes generaciones de dendrímeros tipo PAMAM con distintas proteínas.

Estas moléculas hiper-ramificadas presentan la ventaja de mostrar un grupo funcional deseado de forma multivalente, de manera que se incremente sinérgicamente su acción. En química orgánica sintética, las estructuras dendríticas emergieron como una nueva clase de polímeros llamados moléculas “en cascada”, publicadas por Vögtle y su grupo en 1978 [42]. Más tarde, el desarrollo de estos diseños moleculares junto con el avance de las técnicas sintéticas dio lugar al desarrollo de estructuras dendríticas de mayor tamaño denominadas dendrímeros [43-45].

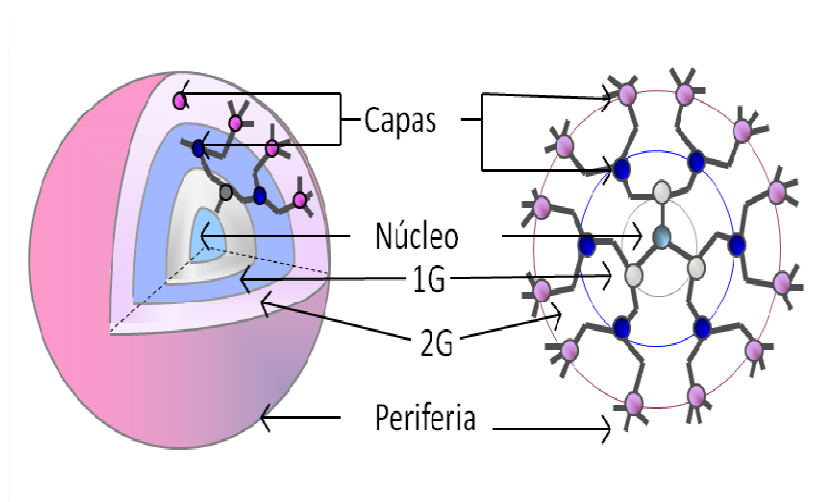


Fig. 5 Representación esquemática de un dendrímero de segunda generación (2G).

La estructura dendrímica está caracterizada por capas entre cada punto focal llamadas *generaciones* (Fig. 5). La definición exacta del término generación ha sido objeto de controversia, aceptándose generalmente el número de puntos focales (o puntos “cascada”) que aparecen desde el núcleo central o *core* hasta la superficie. Un dendrímero de generación 5 presenta por tanto 5 puntos focales entre el núcleo y la superficie. El núcleo es denominado a veces “generación cero”, ya que no presenta ningún punto focal. Por ejemplo, en los dendrímeros tipo polipropilenimina (PPI), el núcleo es 1,4-diaminobutano (debido a este núcleo también reciben el nombre de DAB); en los dendrímeros de polilisina, las ramas de polilisina se sintetizan alrededor del aminoácido lisina; en los dendrímeros tipo poliamidoamina (PAMAM), el núcleo es 1,2 diaminoetano y las terminaciones son grupos amino, pero existen compuestos denominados de “media generación” (1.5G, 2.5G, etc.) que presentan grupos carboxilato en superficie [46]. Los dendrímeros formados por heteroátomos de fósforo, boro o silicio (como los descritos en esta Memoria) constituyen otro ejemplo de esta gran variedad de síntesis [47].

Al crecer la estructura dendrímica, aparecen varios compartimentos. La estructura se divide así en tres partes: La superficie multivalente, con un alto número de sitios reactivos potenciales, el almacén externo, justo por debajo de la superficie con un microambiente protegido de la parte externa por la superficie dendrímica y el núcleo, que en los dendrímeros de alta generación está protegido de las capas circunvalantes, creando un microambiente rodeado por las ramas dendríticas. El interior es por tanto un lugar con potencial para encapsular moléculas-huésped. Las tres partes del dendrímero pueden ser adaptadas específicamente para el propósito diseñado (lograr sensores dendríticos, vehículos para drogas, moléculas iónicas frente a diversos patógenos, etc).

1.2.1. Dendrímeros catiónicos y aniónicos

A modo de ejemplo, se representan en la figura 6 las modificaciones de la superficie de dos tipos de dendrímeros comerciales, obteniendo así un dendrímero catiónico y aniónico con idéntica estructura interna. Los dendrímeros, a pesar de su gran tamaño molecular, son moléculas con estructura bien definida y con baja polidispersidad en comparación con los polímeros tradicionales. A nivel molecular, la estructura ramificada origina estructuras semiglobulares o globulares, la mayoría con una alta densidad de grupos funcionales en su superficie junto con un volumen molecular “pequeño”. Los dendrímeros de mayor generación ocupan un volumen hidrodinámico menor comparado con los polímeros lineales, debido a su estructura globular. Sin embargo, en comparación con las proteínas, los dendrímeros presentan un mayor volumen hidrodinámico [48].

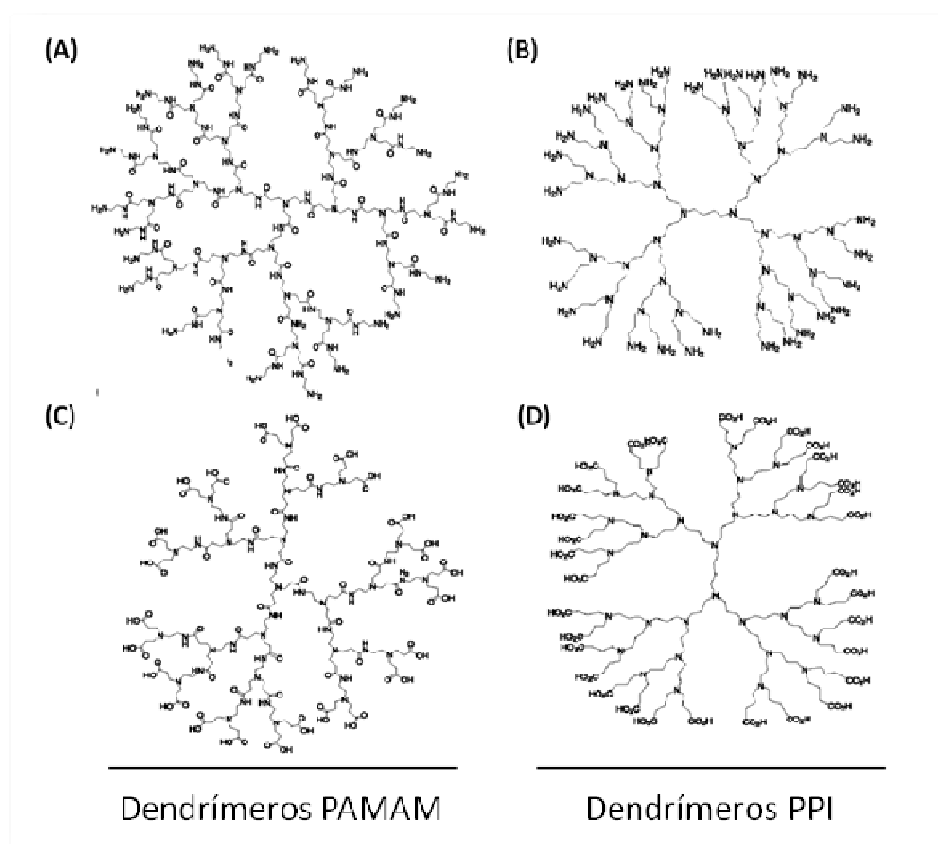


Fig. 6 Representación esquemática de dos tipos de dendrímeros. (A) Generación 3 de un dendrímero PAMAM catiónico. **(B)** Generación 3 de un dendrímero PPI catiónico. **(C)** Generación 2.5 de un dendrímero PAMAM aniónico. **(D)** Generación 3 de un dendrímero PPI aniónico.

1.2.2. Síntesis química de los dendrímeros

Las estructuras dendríticas son sintetizadas en base a dos aproximaciones diferentes, síntesis divergente o convergente, aunque también es posible el uso combinado de ambas (Fig. 7).

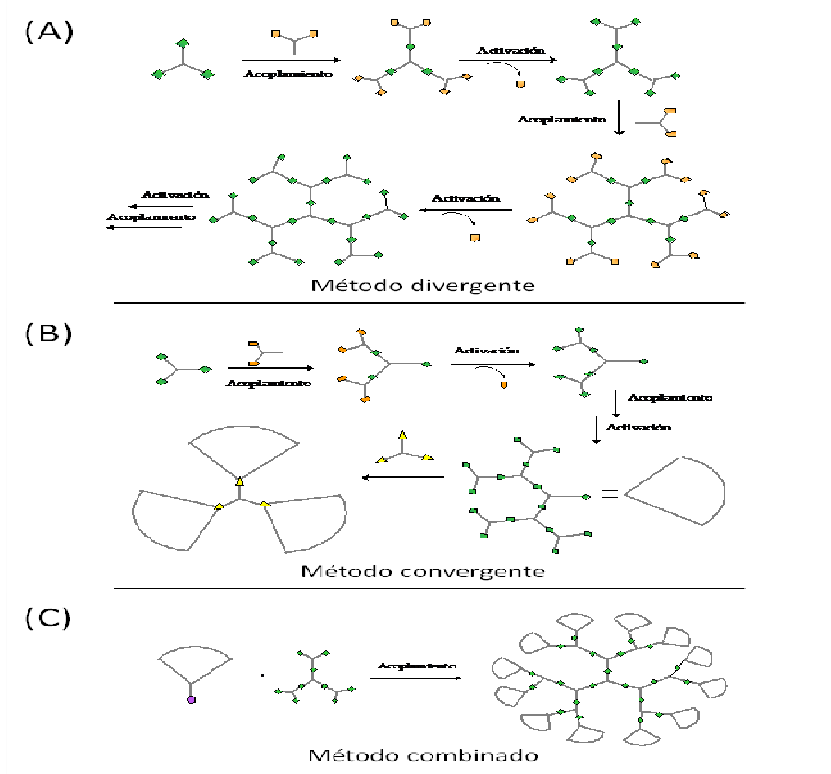


Fig. 7 Esquema de los métodos de síntesis de dendrímeros. (A) Síntesis divergente. (B) Síntesis convergente. (C) Síntesis combinada de las dos anteriores.

En la aproximación divergente, descrita de forma independiente en 1985 por los grupos de investigación de Tomalia [43] y Newkome [49], el dendrímero es sintetizado desde el núcleo como punto de inicio y crecido generación a generación hasta la superficie. Sin embargo, el elevado número de reacciones que tienen que llevarse a cabo sobre una única molécula (con muchos sitios equivalentes de reacción), requiere unas transformaciones muy efectivas para evitar defectos (con un rendimiento en torno al 99 %) (Fig. 7A). La alternativa de síntesis convergente, desarrollada en 1993 por Hawker y Frechet [50] comienza desde la superficie y finaliza en el núcleo, donde los segmentos de dendrímero (o dendrones) son acoplados. En la aproximación convergente, solamente un pequeño número de sitios reactivos son funcionalizados en cada paso, dando lugar a un menor número de defectos, aumentando así el rendimiento. Cada generación sintetizada puede por tanto ser purificada, a pesar de que en los

dendrimeros de gran generación esta tarea es más difícil, por las grandes similitudes entre los reactantes y el producto formado. Sin embargo, con una purificación apropiada en cada paso, se pueden obtener dendrimeros sin defectos por la alternativa convergente (Fig. 7B). Mediante la combinación de los dos métodos, se obtienen dendrimeros híbridos contruidos a partir de un núcleo reactivo polifuncional sintetizado de forma convergente y un dendrón obtenido a través de una síntesis divergente. Así se facilita la purificación y se consigue aliviar la congestión estérica del núcleo polifuncional, aumentando el tamaño de los dendrimeros sintetizados (Fig. 7C).

1.2.3. Propiedades físico-químicas de los dendrimeros

En los inicios de la síntesis de dendrimeros se sugirió que la nanoestructura tridimensional de los dendrimeros de mayor generación haría a estas estructuras similares en cierta forma a las proteínas [51]. Sin embargo, a diferencia de las proteínas, que consisten en cadenas polipeptídicas plegadas, la estructura poliramificada del interior de los dendrimeros está mayoritariamente formada por enlaces covalentes, resultando de alguna manera en una estructura menos flexible. Además, un dendrímtero es en promedio menos compacto que una proteína; por último, el dendrímtero contiene un número sustancialmente mayor de grupos funcionales en la superficie que una proteína de un peso molecular similar [48].

Estudios de dinámica molecular llevados a cabo por varios grupos muestran que los dendrimeros, de forma similar a las proteínas, pueden adoptar una forma nativa (más compacta) o desnaturalizada (extendida), dependiendo de la polaridad, la fuerza iónica y el pH del solvente. Los dendrimeros PPI y PAMAM que contienen aminos primarios en su superficie muestran conformaciones extendidas a pH ácido debido a las repulsiones electrostáticas entre las aminos terciarias protonadas del interior y entre las aminos primarias de la superficie [52]. A $\text{pH} > 9$, se produce un plegamiento como consecuencia de los puentes de hidrógeno entre las aminos terciarias interiores y las primarias de la superficie, dando lugar a un interior más denso [53].

1.2.4. Dendrímeros de estructura carbosilano

El término “dendrímero de estructura carbosilano” se refiere a la molécula dendrítica con un esqueleto formado por enlaces carbono-silicio. Los dendrímeros con átomos de silicio en su estructura fueron las primeras macromoléculas dendríticas sintetizadas que contenían heteroátomos en su esqueleto [54]. Las macromoléculas dendríticas basadas en átomos de silicio se pueden clasificar atendiendo al tipo de unión en el nudo de ramificación (Fig. 8) [55, 56].

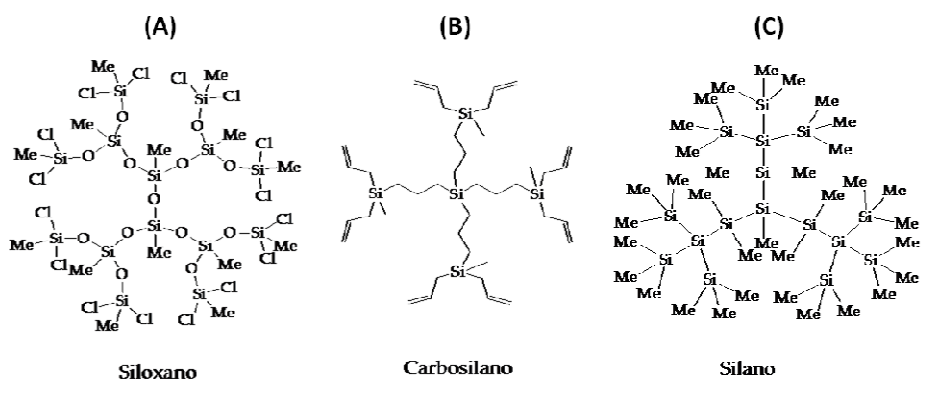


Fig. 8 Clasificación de los dendrímeros de silicio. (A) Dendrímeros tipo siloxano constituidos por uniones Si-O. (B) Dendrímeros tipo carbosilano constituidos por unidades Si-C. (C) Dendrímeros tipo silano caracterizados por la presencia de enlaces Si-Si en su estructura.

El primer ejemplo de dendrímero de tipo polisiloxano con uniones SiO_3C se publicó en 1989 [54]. Los dendrímeros de tipo carbosilano con uniones SiC_4 en los puntos de ramificación se sintetizaron a partir de 1992 y constituyen la clase de dendrímeros más importantes de los que contienen silicio debido a su estabilidad química y térmica y a la posibilidad de sintetizar estas moléculas con generaciones altas (7G) [47]. Los dendrímeros de tipo polisilano con uniones SiSi_4 se conocen desde 1995 y se sintetizaron sólo a generaciones bajas (2G) [47].

Los dendrímeros carbosilanos se sintetizan con buenos rendimientos y son moléculas muy estables cinética y termodinámicamente dado que la energía de disociación del enlace Si-C (306 kJ/mol) es casi tan elevada como la del enlace C-C (345 kJ/mol) y a que la polaridad de los enlaces de su esqueleto es muy reducida o nula [57]. Sin embargo, hasta la fecha, son muy pocos los ejemplos que existen acerca de la síntesis de dendrímeros de silicio policatiónicos y solubles en agua. En 1998 Seyferth y colaboradores publicaron la primera síntesis de dendrímeros de estructura carbosilano solubles en agua [58]. La obtención de dichas macromoléculas se realiza mediante una síntesis divergente que sigue una secuencia iterativa de dos reacciones: alquenilación con reactivos de Grignard e hidrosililación con clorosilanos. En 2001, Lang y colaboradores describieron la síntesis de dendrímeros de estructura siloxano solubles en agua a través de la cuaternización de las aminas situadas en la periferia de los dendrímeros con MeI [59]. Por otro lado, el grupo de investigación de Van Koten sintetizó dendrímeros carbosilano policatiónicos como agentes de transporte de fármacos aniónicos, siguiendo el método de encapsulación [60]. Por último, Schumann y col. describieron la síntesis de dendrímeros solubles en agua que presentan un esqueleto carbosilano y derivados organometálicos de estaño en la periferia, los cuales han sido utilizados como agentes de contraste [61]. Estos dendrímeros organosilano se pueden preparar de diferentes generaciones (tamaño) y con rendimientos elevados.

Las características más importantes de estas macromoléculas son: 1) generalmente son aceites a temperatura ambiente y debido a su geometría globular presentan una baja temperatura de transición vítrea, incluso en las primeras generaciones, 2) pueden dar lugar a una alta multiplicidad de ramificación, dado que el átomo de silicio es tetravalente y se encuentra situado en los nudos de ramificación. Esto indica que la densidad de las estructuras sintetizadas es fácilmente modulable, 3) el esqueleto del dendrímero tiene una naturaleza altamente hidrofóbica en comparación con otros tipos de dendrímeros [47]. Estas características favorecen la aplicación de los dendrímeros carbosilano en diversos campos de la Nanotecnología (catálisis a nanoescala [62, 63], sensores químicos y bioenzimáticos [64], micelas unimoleculares [65]) y en los últimos años, también en el campo de la Nanomedicina (glicotransportadores [66], sistemas de liberación de drogas [67], transportadores de ácidos nucleicos [68-71], antivirales [72-74] y bactericidas [75, 76]).

1.2.5. Características de los dendrímeros en sistemas biológicos

En la Naturaleza se pueden encontrar muchos ejemplos de interacciones multivalentes, desde las uniones divalentes de los anticuerpos y de muchos receptores biológicos hasta las interacciones multivalentes de las patas de la salamandrina con las superficies, que se cuentan por millones [28]. El aumento sinérgico de la actividad de un sistema multivalente respecto a uno monovalente es denominado “efecto dendrítico” [29,30]. La multivalencia puede incrementar además la especificidad de una interacción dada, esencialmente incrementando la afinidad por el ligando [31]. Los sistemas biológicos están repletos de ejemplos de interacciones multivalentes, y esto puede ser debido a que las interacciones multivalentes proveen de un incremento en la fuerza de unión respecto a los ligandos simples y unas interacciones célula-célula más eficientes [32]. Los factores que pueden jugar un papel en estas interacciones incluyen obviamente la geometría de los ligandos y la flexibilidad de su unión al dendrímero. Por todo ello, los dendrímeros tienen el potencial de imitar la multivalencia de algunos sistemas biológicos de forma bien definida.

Con el objetivo de utilizar un dendrímero en biomedicina, éste debe cumplir varias condiciones de importancia crucial: 1) no ser tóxico, 2) no ser inmunogénico (excepto para vacunas), 3) atravesar barreras biológicas (ej. la barrera hematoencefálica, membranas celulares, intestino, pared vascular, etc.), 4) ser estable y permanecer en circulación el tiempo necesario para tener el efecto clínico buscado, 5) Ser capaz de dirigirse a dianas específicas.

Generalmente, los dendrímeros y las macromoléculas catiónicas causan la desestabilización de la membrana celular induciendo lisis celular [77]. El mecanismo exacto de la citotoxicidad causada por estas estructuras no se conoce completamente. Inicialmente, estudios comparativos de citotoxicidad sobre diferentes líneas celulares concluyeron que los dendrímeros tipo PAMAM catiónicos amino-terminados (PAMAM+) presentaban menor citotoxicidad que los dendrímeros basados en lisina. Sin embargo, cuando los PAMAM+ se estudiaron sobre células de adenocarcinoma humano Caco-2, mostraron una toxicidad importante [78, 79]. La toxicidad mostró ser dependiente de la generación, siendo los dendrímeros de mayor generación los más tóxicos [78, 79] y en

general, este hecho se relaciona con el efecto de los polímeros con mayor peso molecular de exhibir una mayor citotoxicidad [80]. Además, los estudios de toxicidad en hematíes con los PAMAM+ mostraron que dichos dendrímeros tenían un efecto hemolítico sobre una solución de hematíes de rata que también se incrementaba con la generación del dendrímero [81]. Posteriormente, se demostró que los PAMAM+ con una estructura globular y poco flexible, presentaban menos toxicidad que los dendrímeros lineales con aminas (más flexibles) [82]. Esto pudiera ser explicado por la menor adherencia de las estructuras menos flexibles y globulares de los PAMAM+ a las superficies celulares. El grado de sustitución en la funcionalidad de las aminas es importante, siendo las aminas primarias más tóxicas que las secundarias o terciarias [80]. Esto se puede explicar por el mayor apantallamiento de la carga positiva del nitrógeno por los sustituyentes de mayor tamaño (ej. grupos alquilo) comparado con los átomos de hidrógeno de las aminas primarias. Para los dendrímeros de tipo PPI catiónicos amino terminados (PPI+) se encontró un efecto similar de toxicidad dependiente de la generación [83]. Como sucede con los PAMAM+, los PPI+ de mayor generación mostraron ser los más hemolíticos en hematíes de rata [81].

En resumen, los dendrímeros amino-terminados suelen ser citotóxicos posiblemente debido a las interacciones entre la superficie catiónica del dendrímero y la superficie cargada negativamente de las membranas celulares, permitiendo a dichos dendrímeros adherirse a la superficie celular y dañarla, causando la lisis celular. Pero los dendrímeros de tipo PAMAM aniónicos con grupos carboxilato en su superficie (PAMAM-) presentaron menor toxicidad que los PAMAM+ [79]. La toxicidad de los dendrímeros está determinada por la naturaleza de los grupos de superficie y por la naturaleza química del esqueleto dendrimérico. Dendrímeros con esqueleto aromático poliéter con grupos carboxilato en superficie fueron hemolíticos para hematíes en modelo de rata, probablemente porque el interior aromático causó hemólisis debido a contactos hidrofóbicos con la membrana [81].

La utilización de aditivos puede reducir la citotoxicidad de forma importante en los dendrímeros amino-terminados. Por ejemplo, la adición al medio de cultivo de suero de ternera fetal (STF) reduce la toxicidad de PAMAM+ modificados con el fluoróforo *Oregon-Green* en células HeLa respecto al PAMAM+ solo [84]. Además, la toxicidad de los PAMAM+ disminuye cuando forman complejos con ADN [85, 86]. Esto indica que la

unión no covalente entre los dendrímeros y el ADN, ARN o las proteínas lleva a un efecto de atenuación del polielectroforesis, similar al que se obtiene por modificación covalente de las aminas de superficie. Sin embargo, estas observaciones difieren de otros estudios de citotoxicidad de complejos entre polielectroforesis y ADN, donde los PAMAM+ mostraron la misma o mayor toxicidad cuando se unieron a ADN [87]; en este caso, la toxicidad no puede ser atribuida a la carga electrostática de superficie, sino a la gran cantidad de ADN introducido en las células por el dendrímero, lo cual puede llevar a apoptosis [88].

La toxicidad de los dendrímeros depende en gran medida de las líneas celulares sobre las que se ensayen, existiendo unas líneas más sensibles que otras. Los cultivos primarios son en general más sensibles a la toxicidad ante cualquier desafío con una droga que las líneas de cultivo establecidas o inmortalizadas. Los dendrímeros más estudiados en aplicaciones *in vivo* son los PAMAM+. En relación con la toxicidad, la inyección en ratones de concentraciones de 10 mg kg^{-1} de PAMAM hasta generación 5 no inducía toxicidad, independientemente de si presentan modificaciones o no en la superficie [89, 90]. Es más, la inyección de PAMAM+ no modificados junto con ovoalbúmina en ratones no fue tóxica, no se observó pérdida de peso, ni formación de granulomas, ni hemólisis o inflamación [91]. Dendrímeros poliésteres con terminaciones hidróxido o metóxido mostraron no ser tóxicos tanto *in vitro* como *in vivo* y aunque a altas concentraciones (40 mg mL^{-1}) indujeron cierta inhibición del crecimiento celular *in vitro*, no se observó mortalidad celular [92, 93]; cuando se inyectaron en ratones, no se observaron fenómenos de toxicidad aguda ni a largo plazo. Las propiedades no tóxicas hacen de estos nuevos dendrímeros moléculas prometedoras biodegradables para el transporte de drogas, ya que el dendrímero puede ser degradado por enzimas hidrolíticas después de la liberación de la droga.

Los estudios sistemáticos iniciales realizados con dendrímeros PAMAM+ mostraron baja o ninguna inmunogenicidad de los dendrímeros de tercera a séptima generación [90, 91]. Sin embargo, estudios posteriores mostraron cierto grado de inmunogenicidad de los PAMAM+, pero la modificación de las terminaciones amino con cadenas de polietilenglicol (PEG) disminuyó este efecto y aumentó la semivida plasmática de los PAMAM+ modificados en comparación con los PAMAM no modificados [94]. Las cadenas de PEG aumentan la hidrofilia del dendrímero, creando una superficie altamente hidratada que induce pocas alteraciones con el microambiente

fisiológico que le rodea. Sin embargo, la superficie del dendrímero se puede modificar con antígenos o epítopos T dependientes, creando compuestos muy inmunogénicos.

Para atravesar barreras biológicas, se estudiaron distintas aproximaciones para aumentar la capacidad de transfección del complejo PAMAM+/ADN (dendriplex) [86, 95]. En los dendrímeros de polilisina, la eficacia de transfección se aumenta añadiendo en su superficie PEG; sin embargo, el porcentaje global de transfección con estos dendrímeros es bajo, probablemente por la liberación moderada de ADN [96]. Las investigaciones concluyeron que la forma esférica de los dendrímeros no constituye una ventaja para el transporte de ADN al interior celular, mostrando los dendrímeros fragmentados por calor o por la acción de detergentes, una eficacia superior de transfección respecto a los no degradados con una forma esférica completa [97].

1.2.6. Aplicaciones biomédicas de los dendrímeros

El desarrollo de nuevos nano-polímeros biocompatibles se ha convertido en un importante objetivo de las compañías dedicadas a la biotecnología. Las posibles aplicaciones biofarmacéuticas de estos nanopolímeros han mostrado ser múltiples:

1) *Transporte de fármacos*, con el fin de aumentar la biodisponibilidad y la fracción activa de los mismos; liberación controlada de fármacos, con el fin de prolongar y/o distribuir mejor su efecto a lo largo del tiempo [50, 98, 99]

2) En *terapia génica*, una de las facetas más estudiadas de estos nanopolímeros es la relacionada con su potencial para el transporte de ADN, ARN y plásmidos al interior de las células (Fig. 9) [83-86, 100-102]

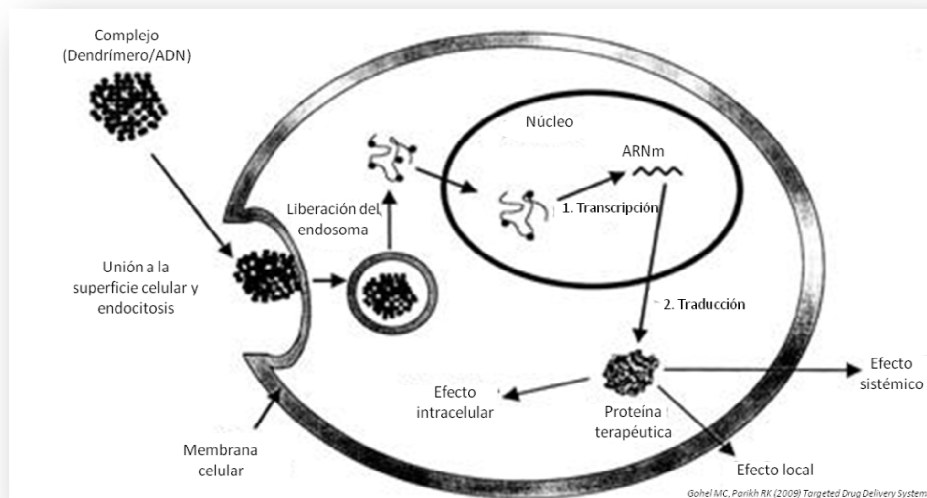


Figure 9: Esquema del mecanismo de acción del complejo dendrímero/ADN en terapia génica

3) *Medicamentos dirigidos*, por ejemplo los glico-transportadores [103-106][107].

4) *Antivirales*, interfiriendo con el ciclo replicativo del virus o como dispositivo barrera para la prevención de enfermedades de transmisión sexual (Fig. 10 y 11) [39, 82, 89, 107-118].

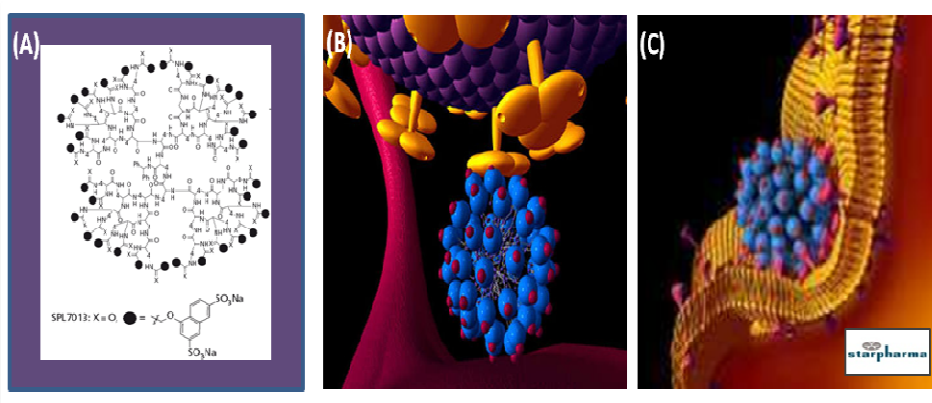


Fig. 10 Dendrímeros polianiónicos como antivirales. (A) Ejemplo de un dendrímero polianiónico con grupos naftil sulfonato en la periferia (SPL7013 o VivaGel®). **(B)** VivaGel interactuando con la proteína gp120 del VIH y **(C)** la superficie de la membrana celular.

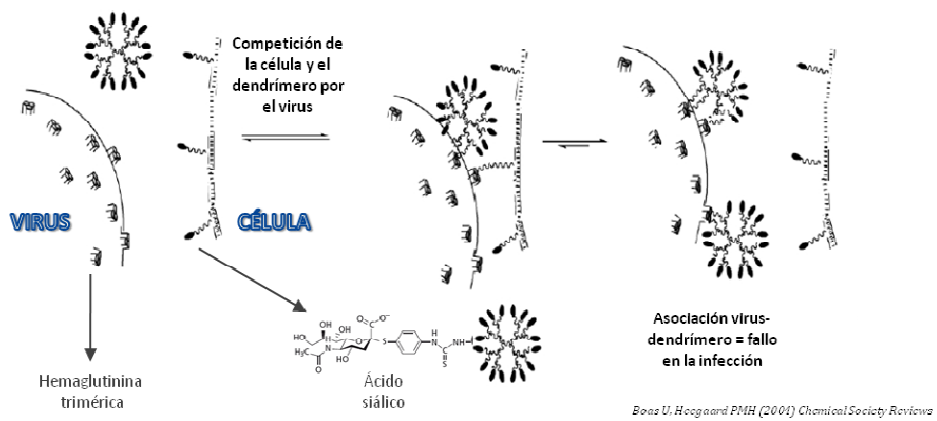


Fig. 11 Dendrímeros con monosacáridos como antivirales. Ejemplo de un dendrímero con terminaciones de ácido siálico en la periferia, interaccionando con la hemaglutinina trimérica del virus.

- 5) Antiinflamatorios [119]
- 6) Análogos de heparina [120-122]
- 7) Antibacterianos y antifúngicos [123-125]
- 8) Antitumorales [126-128]
- 9) Desnaturalizantes de proteínas [129, 130]
- 10) En vacunas, actuando como soporte estructural de péptidos antigénicos en el diseño de estrategias vacunales [91, 131-139]
- 11) Reparación de tejidos [140-142]

En conclusión, los dendrímeros son polímeros sintéticos con una forma globular bien definida y con una serie de propiedades excelentes para su uso en aplicaciones biológicas. Responden de forma predecible en solución, pueden ser modificados ampliamente para portar múltiples ligandos con actividad biológica, pueden atravesar barreras biológicas y son fabricados con muy pocos defectos estructurales, lo cual hace fácil su análisis por medios como espectrometría de masas, espectroscopía de infrarrojos o resonancia magnética nuclear (RMN). En la actualidad existen diversas instituciones, empresas farmacéuticas y empresas de biotecnología que administran más de 30 patentes mundiales de dendrímeros y se estudia su aplicación en la prevención, diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades [143].

En el campo de la prevención, existen dendrímeros utilizados como microbicidas para impedir la infección por VIH [39]. El dendrímero SPL7013 (Vivagel®, Starpharma Pty, Ltd.) se encuentra en desarrollo como fórmula de aplicación tópica vaginal para impedir la infección del virus durante el acto sexual. Este dendrímero es actualmente el primero y el único tratamiento basado en dendrímeros que está autorizado para proceder con los ensayos clínicos por la FDA (*Food and Drug Administration*). La fase I de ensayos en humanos ya ha sido ensayada con éxito. En la evaluación diagnóstica, se ha publicado una aplicación interesante de un dendrímero de gadolinio utilizado para diagnosticar fallo renal agudo inducido por sepsis mediante imágenes de resonancia magnética [144]. Como tratamiento avanzado en preclínica, dendrímeros de quinta generación se estudian por el grupo de James Baker y col. como transportadores de un fármaco citostático, el metotrexato (MTX), y funcionalizados con ácido fólico (FA) en su superficie [145]. El conjugado resultante, G5-FA-MTX ha demostrado su eficacia y especificidad en células con receptor de ácido fólico *in vitro* e *in vivo*. Los estudios en fase clínica deberán demostrar que este conjugado tiene una viabilidad para el tratamiento del cáncer.

1.3 APLICACIONES BIOLÓGICAS DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos (ODN) son pequeñas cadenas de nucleótidos (del griego *oligos* = pocos), la unidad elemental de los ácidos nucleicos: ARN cuando el azúcar es ribosa y ADN cuando es desoxirribosa. Como todos los ácidos nucleicos, son polímeros lineales que portan información biológica codificada en las secuencias de bases adenina, guanina, citosina y timidina en el ADN o uracilo en el ARN. De acuerdo con el modelo de Watson y Crick, 3 puentes de hidrógeno se forman entre la guanina y la citosina y dos entre la adenina y la timidina o uracilo. Los dúplex se pueden formar entre dos cadenas de ADN, dos de ARN o entre una cadena de ARN y una de ADN. Los ODN se pueden sintetizar a nivel industrial, lo que hace que sean relativamente económicos; Por ello se utilizan como herramientas en diagnóstico *in vitro*, ya que son elementos básicos para métodos de biología molecular tales como PCR, *arrays*, hibridación *in situ*, etc.

Debido a su especificidad de unión a la diana, su facilidad de fabricación y capacidad de variar su secuencia, se han estudiado ampliamente en “terapia antisentido” (unión a un ARNm determinado para impedir la traducción proteica, Fig.12) [146]. Los ODN naturales tienen una estabilidad, afinidad y capacidad de paso a través de membranas baja [147]; Se han probado numerosas modificaciones químicas en la estructura del ODN para aumentar su estabilidad y biodisponibilidad: ODN fosforotioato [148], ODN híbrido metil-fosfonato-fosfodiéster [149, 150], ODN de ribosa 2' O-metil modificados [151, 152], ácidos nucleicos peptídicos (PNA) [153], etc.

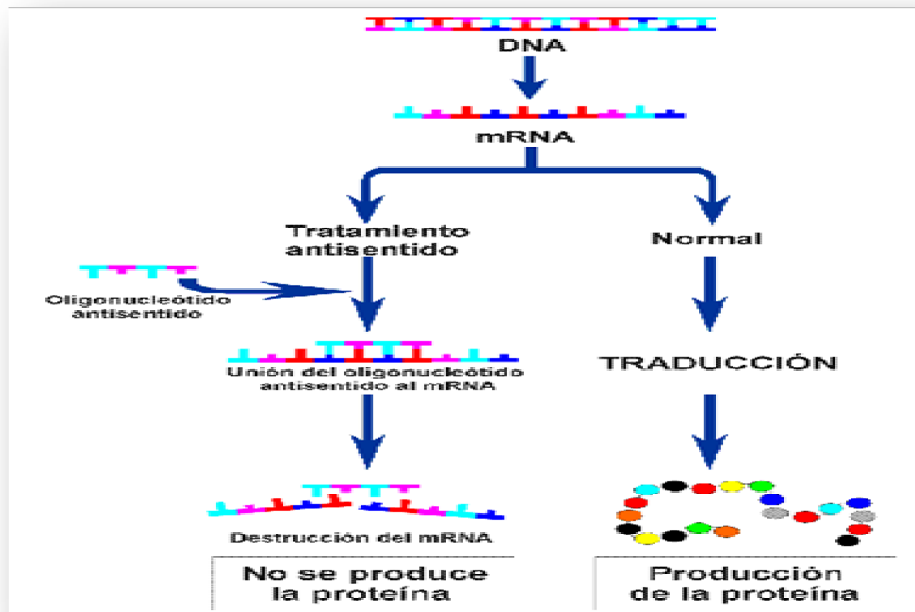


Fig. 12 Fundamento de la terapia con oligonucleótidos antisentido

1.3.1 Oligonucleótidos antisentido

El mecanismo de inhibición es debido al reconocimiento por parte de la ribonucleasa H de la secuencia del dúplex formado y destrucción del ARNm, aunque también se produce un impedimento estérico del *splicing* (rotura) del pre-ARNm que limita la iniciación de la traducción y/o mediante. Los ODN antisentido se han utilizado ampliamente para inhibir la síntesis proteica en diferentes sistemas biológicos [154, 155]. Este método de regulación génica es muy sencillo de diseñar y cuenta con un alto número de aplicaciones terapéuticas: cáncer, infecciones virales, trastornos inflamatorios, metabólicos, etc. [156, 157].

Existen más de 50 ensayos clínicos con ODN antisentido, la mayoría en fase II [158]. Aproximadamente la mitad de los ODN de estos ensayos clínicos son de tipo fosforotioato: el 80 % tienen como diana genes tumorales, el 10 % genes de patógenos como VIH o VHC, y otro 10 % se están estudiando en el contexto de enfermedades

inflamatorias como la enfermedad de Crohn y la rectocolitis hemorrágica. Un ejemplo muy representativo es el Vitravene, que se aprobó para su uso en humanos por la FDA para el tratamiento de la retinitis por citomegalovirus [159].

1.3.2 Problemas de las terapias con oligonucleótidos antisentido

Existen tres problemas principales a los que se enfrentan las terapias con ODN antisentido: 1) su estabilidad *in vivo*, que se ha solventado por la síntesis de las múltiples modificaciones en el esqueleto azúcar-fosfato ya comentadas previamente. No obstante, las modificaciones químicas que alteran la sensibilidad a nucleasas de un ODN pueden modificar también su farmacocinética y capacidad de hibridación con la diana. Otra aproximación para aumentar su estabilidad es acoplar los ODN a vectores o agentes de transporte, tales como los dendrímeros; 2) el acceso a las secuencias diana, ya que para acceder a las secuencias de ARNm intracelulares, los ODN deben atravesar las membranas celulares, cosa que hacen con mucha dificultad debido a su baja liposolubilidad. Además, los ARNm son moléculas altamente estructuradas que exhiben estructuras en doble cadena como *stem-loops*, horquillas, nudos, etc. dejando poco espacio para la unión de ODN *in vivo*. Se ha demostrado que, en los mejores casos, no más del 6-12 % de los ODN son eficaces para unirse a su secuencia diana y dar lugar al efecto antisentido [160]; 3) interacciones no específicas. Se han descrito interacciones no específicas con proteínas sobre todo para los ODN fosforotioato [161, 162], las cuales pueden inducir en algunos casos efectos tóxicos [163]. Los ODN fosfodiéster se unen en un 90 % con una proteína de membrana de 70 kDa [164, 165]. En presencia de suero, los fosforotioatos se unen a albúmina [162, 164] y a otras proteínas plasmáticas [166]. Debido a la tendencia a unirse a proteínas, uno de los principales problemas de la terapia con ODN es la de conseguir unos niveles adecuados para lograr el efecto terapéutico, ya que se necesita administrar cantidades altas de ODN para lograr un efecto biológico. Para solventar estos problemas, los transportadores de ODN actuarían como caballos de Troya, impidiendo la acción de las nucleasas sobre el ODN, evitando su unión a proteínas y ayudándole a pasar las barreras fisiológicas [167].

Una de las aproximaciones clásicas con ODN antisentido es su utilización en técnicas de imagen, marcándolos con emisores gamma o emisores de positrones [147]. Para transportarlos, una opción son los lípidos catiónicos, que forman complejo electrostático con el ODN (lipoplex) [168]. Uno de los principales inconvenientes para las aplicaciones biológicas de los lipoplexes es su inactivación por unión inespecífica a proteínas del suero. En este aspecto, se han postulado formulaciones lipídicas que dotan de una carga neta neutra al lipoplex que pueden suponer una alternativa [169]. Otra de las alternativas es la de utilizar polímeros catiónicos tales como los dendrímeros. Se puede aplicar ODN marcado con I^{125} e inducir daño en lugares específicos del genoma [170], debido a que un ODN puede asociarse con una doble hélice de ADN a través de uniones de tipo Hoogsteen para formar una triple hélice y bloquear la expresión génica [171]. También se han descrito como inmunomoduladores, ya que los ODN con secuencias CpG no metiladas mimetizan secuencias bacterianas y ejercen sus efectos por su unión al receptor intracelular 9 (*TLR-9*), constituyendo el primer paso en el reclutamiento de una serie de mecanismos de la inmunidad innata y adquirida necesarios para hacer frente a distintas enfermedades [172, 173].

1.3.3 Comparación del mecanismo de silenciamiento génico de oligonucleótidos antisentido y ARN de interferencia

Los ARN de interferencia (siRNA) son pequeños ARN de cadena doble los cuales son capaces de inhibir la traducción de una determinada proteína endógena o exógena (patógeno) al inducir la degradación de su ARN homólogo (Fig. 13). Aunque la existencia de estos ARN de interferencia fue descrita en primer lugar en plantas y hongos, pronto se describió en protozoos, organismos animales (*drosophila*) y en células de mamífero. Fire y Mello denominaron a estas moléculas de ARN que median el silenciamiento génico “ARN de interferencia” [174]. En plantas, este fenómeno también recibe el nombre de “silenciamiento génico postranscripcional (PTGS)” [175].

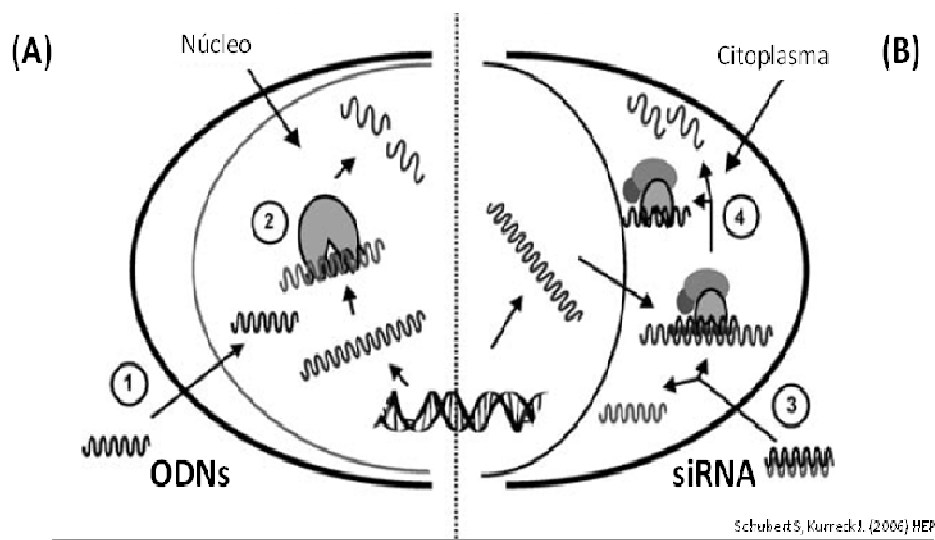


Fig. 13 Comparación del mecanismo de silenciamiento génico de oligonucleótidos y siRNA. Los ODN ejercen su acción predominantemente en el núcleo (A), mientras que los siRNA interaccionan principalmente en el citoplasma (B). (1) El ODN antisentido es transportado al interior del núcleo y se une por pares de bases al ARNm de secuencia complementaria. (2) La ARNasa H es reclutada por la hélice híbrida y la fracción de ARN se rompe. (3) Una de las hebras es incorporada a un complejo proteico llamado RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), mientras que la otra hebra es descartada. El siRNA guía a RISC a una secuencia complementaria del ARN diana. (4) Tras la unión, la rotura de la molécula diana es inducida. RISC puede procesar múltiples etapas de rotura.

Existen múltiples grupos que investigan el papel de estos ARN en el estudio del proteoma: modulación de la expresión de distintas proteínas celulares por los siRNA, o que usan siRNA para evaluar la función de dichas proteínas estudiando qué sucede al suprimir su presencia [176]; se están desarrollando siRNA inhibidores del ciclo replicativo del VIH para inhibir la síntesis de los receptores celulares que utiliza el virus para infectar las células [177-179]. Para facilitar estos objetivos, se ha desarrollado en los últimos años una amplia gama de tecnologías de trabajo con siRNA, los cuales se sintetizan químicamente o se expresan mediante plásmidos codificantes [180].

En definitiva, para que las terapias con ODN o siRNA puedan llegar a ser una alternativa real de tratamiento hay que soslayar ciertos inconvenientes. La aplicación de dendrímeros de tipo carbosilano como transportadores pudiera contribuir a solucionar estos problemas. Se eligieron dendrímeros de tipo carbosilano para las pruebas biológicas por constar de una estructura basada en el silicio, presente en otros tipos de biomateriales como materiales protésicos, los cuales presentan una biocompatibilidad elevada con baja inmunogenicidad. Como ya se ha mencionado, se estudiará en esta Memoria la biocompatibilidad de los dendrímeros carbosilano catiónicos (DEC+) sobre modelos de cultivos primarios de linfocitos y hematíes, sus interacciones con ODN fosforotioato, su antigenicidad, la captación del complejo DEC+/ADN por parte de distintos cultivos primarios y líneas celulares, así como el efecto en la replicación del VIH de DEC+ y ODN. Por otra parte, se estudiará la biocompatibilidad de los dendrímeros de estructura carbosilano aniónicos (DEC-) en líneas epiteliales vaginales y en cultivos primarios, la interacción con diferentes aislados virales y su implicación en la transmisión viral y la toxicidad en un modelo vaginal *in vivo*.



2. OBJETIVOS

En la última década, más de 3500 publicaciones contienen referencias de dendrímeros aplicados a distintos campos de la Ciencia. En 2010, más de 30 publicaciones describen a estos polímeros nanoscópicos potencialmente útiles en nanomedicina. Se pretende en este Memoria evaluar algunas de las aplicaciones Biomédicas de dendrímeros de estructura carbosilano. Se eligieron estos dendrímeros para las pruebas biológicas por constar de una estructura basada en el silicio, presente en otros tipos de biomateriales (como ejemplo en materiales protésicos), los cuales presentan una biocompatibilidad elevada con baja inmunogenicidad.

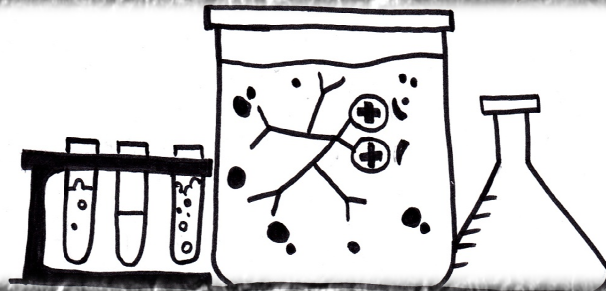
Como ejemplos de aplicabilidad, los esfuerzos se centraron en evaluar la capacidad de los dendrímeros catiónicos como transportadores de oligonucleótidos (ODN) y la capacidad de los dendrímeros aniónicos como moléculas antivirales (microbicidas).

Para ello se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP), macrófagos (MΦ) y células dendríticas (CD), por tratarse de un buen modelo fisiológico. Además, como primera barrera contra la infección por el VIH adquirida sexualmente se utilizaron células del epitelio vaginal (VK2/E6E7) y células del epitelio endometrial (HEC-1A) formando una monocapa *in vitro* de células polarizadas.

Por tanto, los objetivos planteados en esta Memoria fueron:

1. Estudiar el comportamiento químico y la solubilidad en agua de dendrímeros con estructura carbosilano catiónicos y aniónicos.
2. Estudiar la capacidad de unión de los dendrímeros carbosilano catiónicos a los ácidos nucleicos (ODN principalmente) para generar dendriplexes (complejos ADN-dendrímero) y caracterizar la estabilidad de dicha unión en solución acuosa en distintas condiciones (pH del medio, tiempo de unión e interacción con proteínas plasmáticas).

3. Estudiar la biocompatibilidad de dendrímeros carbosilano catiónicos y aniónicos en diversas líneas celulares y cultivos primarios susceptibles a la infección por el VIH.
4. Estudiar la capacidad de los dendrímeros carbosilano catiónicos como transportadores de ODN antisentido del VIH y la influencia de los dendriplexes en el ciclo replicativo del VIH.
5. Estudiar el efecto de los dendrímeros carbosilano aniónicos en la prevención de la transmisión del VIH a través de una monocapa de células HEC-1A y VK2/E6E7 y la respuesta pro-inflamatorio de dichas células.
6. Estudiar el efecto de los dendrímeros carbosilano aniónicos en la prevención de la infección por VIH de cultivos primarios de CMSP, MΦ y CD.
7. Estudiar si los dendrímeros carbosilano aniónicos producen irritación vaginal *in vivo* tras la administración repetida en conejas, primer ensayo preclínico para la formulación de un microbicida.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DENDRÍMEROS DE ESTRUCTURA CARBOSILANO

Todos los dendrímeros de estructura carbosilano (DEC) utilizados en esta Memoria fueron sintetizados por el grupo de Dendrímeros para Aplicaciones Biomédicas (BIOINDEN) perteneciente al Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá de Henares y su caracterización se llevó a cabo mediante las técnicas de espectroscopía de RMN de ^1H , ^{13}C y ^{29}Si , espectroscopía de masas y análisis elemental de C, H y N [181-183].

3.1.1. Síntesis y solubilidad de los dendrímeros de estructura carbosilano catiónicos

Los dendrímeros de estructura carbosilano catiónicos (DEC+) utilizados en esta Memoria se sintetizaron por el método divergente y se caracterizan por tener un enlace Si-O próximo a la amina cuaternaria terminal que les proporciona una hidrólisis lenta en agua y otros disolventes próticos, lo que puede conferir a estos derivados la capacidad de convertirse en agentes de liberación controlada. Los DEC+ presentan una alta versatilidad: posibilidad de modificar la longitud de las ramas utilizando derivados de Grignard vinílicos o alílicos y de incorporar diversos grupos funcionales a la periferia del dendrímero, variabilidad del número de ramificaciones de cada generación (cambiando HSiCl_3 por HSiMeCl_2 en la hidrosililación), etc. Además, son moléculas que presentan una gran inercia química, requisito indispensable para la obtención de un vector no viral eficaz.

Una de las diferencias importantes entre el silicio y el carbono radica en que la capa de valencia del carbono está completamente ocupada en todos sus compuestos. Por el contrario, el silicio tiene la posibilidad de adicionar electrones extra a su capa de valencia utilizando los orbitales 3d. Estos orbitales 3d proporcionan una vía accesible a la interacción con moléculas de agua, las cuales ceden uno de sus pares de electrones solitarios a un orbital 3d vacante para formar el complejo activado (estado de transición). Por esta razón los DEC+ son moléculas higroscópicas y una vez sintetizadas

se mantienen bajo atmosfera de argón hasta ser envasadas para su utilización en un determinado experimento.

Los DEC+ utilizados en esta Memoria se detallan en la figura 14:

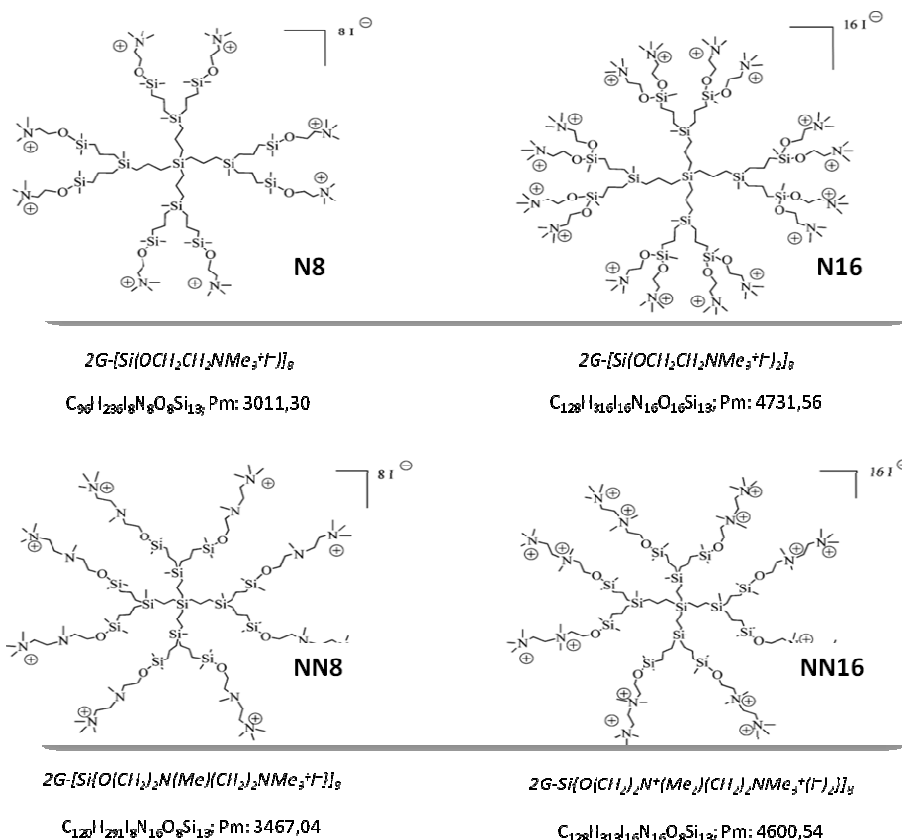


Fig. 14 Segunda generación de dendrímeros de estructura carbosilano con grupos amino cuaternarios funcionales (DEC+). N8 <> $2G-[Si(OCH_2CH_2NMe_3^+I^-)]_8$; N16 <> $2G-[Si(OCH_2CH_2NMe_3^+I^-)]_{16}$; NN8 <> $2G-[Si(O(CH_2)_2N(Me)(CH_2)_2NMe_3^+I^-)]_8$; NN16 <> $2G-[Si(O(CH_2)_2N^+(Me)(CH_2)_2NMe_3^+(I^-)_2)]_8$. Pm: Peso molecular (g/mol).

La primera nomenclatura corresponde con una terminología química más detallada donde se indica la generación del dendrímero y las ramas periféricas de las que consta. Cada generación se forma a partir de la capa de átomos de silicio que rodean al núcleo. De esta forma el silicio central se corresponde con la generación cero. Los siguientes cuatro silicios representan la generación 1 y finalmente los 8 silicios más externos, la generación 2 (Fig. 14). Esto es independiente del número de grupos terminales que posee el dendrímero, ya que una segunda generación puede contener 8

o 16 grupos terminales, así como uno o dos nitrógenos en cada rama (N o NN, respectivamente). En la segunda nomenclatura se muestra la composición química de la molécula, seguida de su peso molecular (Fig. 14). En esta Memoria se han utilizado las siglas equivalentes N8, N16, NN8, NN16 para un seguimiento más sencillo en todos los experimentos.

El procedimiento de síntesis química de todos los DEC+ de esta Memoria se inscribió en la oficina española de patentes y marcas en 2005 con el título *Nuevos dendrímeros carbosilanos, su preparación y sus usos* [181] y la síntesis completa del dendrímero NN16 se publicó en el artículo de Chonco y col. en 2007 [69].

Los DEC+ se disolvieron en agua destilada estéril (Braun®) en el momento que se realizaba el experimento a una concentración de 1 mM agitando ligeramente (Fig. 15).



Fig. 15 Solubilidad de los DEC+. El día del experimento, se utilizó un desencapsulador para diluir en agua destilada estéril los DEC+ a una concentración de 1 mM.

Para alcanzar las concentraciones requeridas en cada tipo de ensayo o experimento, se realizaron las diluciones de los DEC+ en PBS (BioWhittaker, Walkersville, MD) o medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco BRL).

3.1.2. Síntesis y solubilidad de los dendrímeros de estructura carbosilano aniónicos

Los dendrímeros de estructura carbosilano aniónicos (DEC-) utilizados en esta Memoria son moléculas estables en solución. Estos DEC- presentan una gran variedad de modificaciones tanto en su estructura química como en los grupos periféricos con grupos carboxilato y grupos sulfonatos en la periferia o grupos sulfonato en la periferia y núcleo polifenólico (Figs. 16-18).

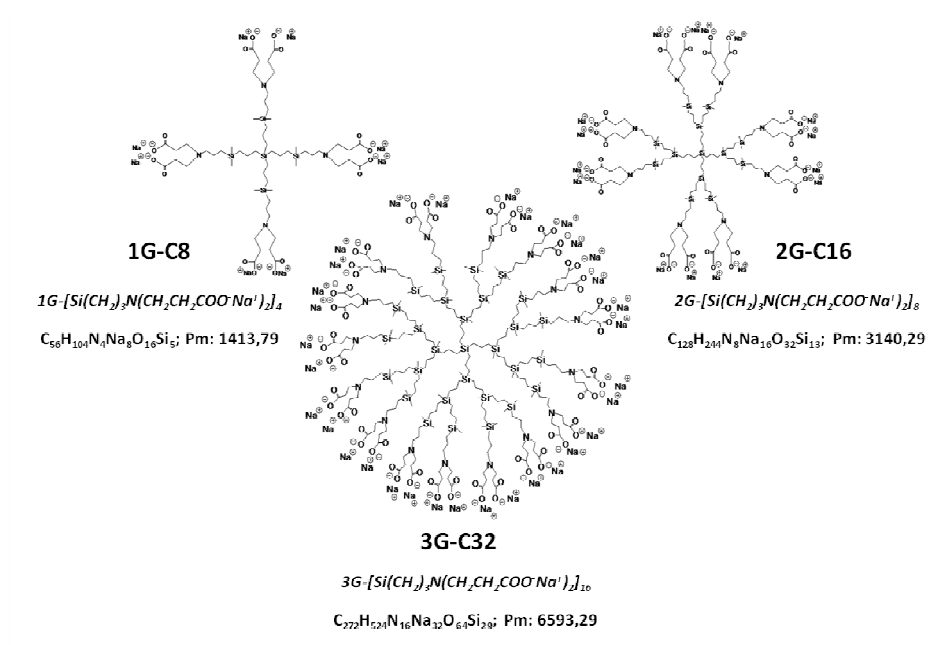


Fig. 16 Representación molecular de las tres generaciones de DEC- con grupos carboxilato en la periferia. 1G-C8 <> $1G-[Si(CH_2)_3N(CH_2CH_2COO^-Na^+)_2]_4$; 2G-C16 <> $2G-[Si(CH_2)_3N(CH_2CH_2COO^-Na^+)_2]_8$; 3G-C32 <> $3G-[Si(CH_2)_3N(CH_2CH_2COO^-Na^+)_2]_{16}$. Pm: Peso molecular (g/mol).

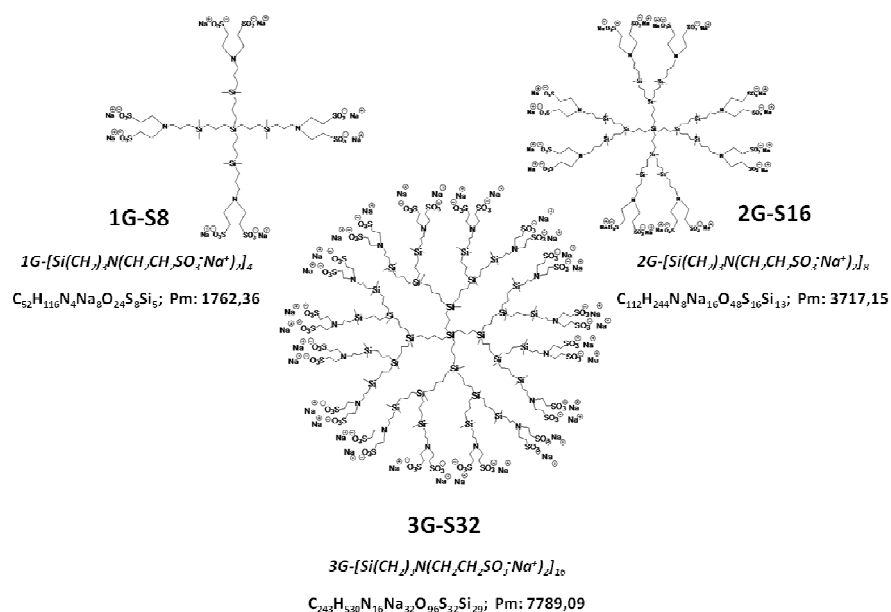


Fig. 17 Representación molecular de las tres generaciones de DEC- con grupos sulfonato en la periferia. 1G-S8 <> $1G-[Si(CH_2)_3N(CH_2CH_2SO_3^-Na^+)]_4$; 2G-S16 <> $2G-[Si(CH_2)_3N(CH_2CH_2SO_3^-Na^+)]_{16}$; 3G-S32 <> $3G-[Si(CH_2)_3N(CH_2CH_2SO_3^-Na^+)]_{32}$. Pm: Peso molecular (g/mol).

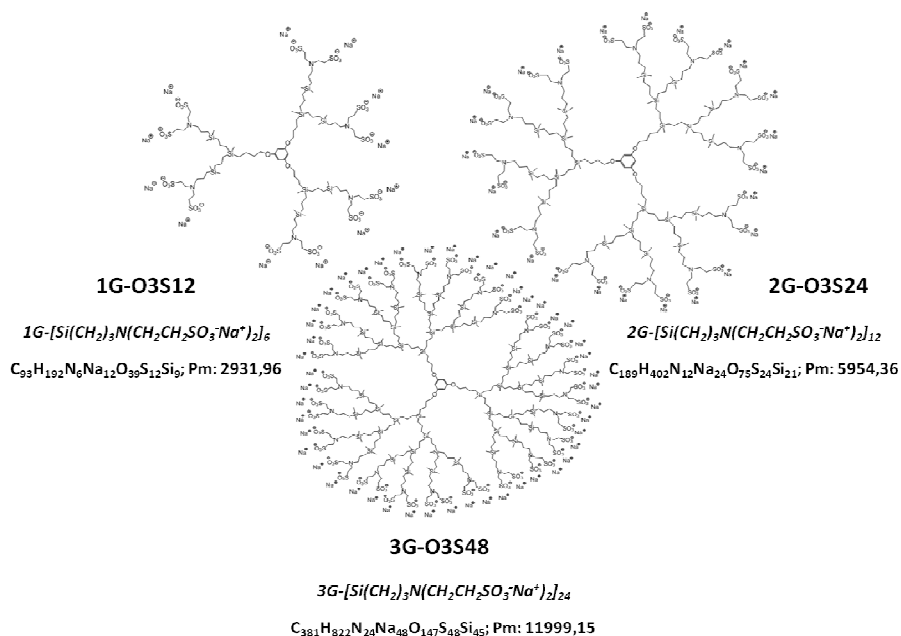


Fig. 18 Representación molecular de las tres generaciones de DEC- con grupos sulfonato en la periferia y núcleo polifenólico. 1G-O3S12 <> $1G-[Si(CH_2)_3N(CH_2CH_2SO_3^-Na^+)]_6$; 2G-O3S16 <> $2G-[Si(CH_2)_3N(CH_2CH_2SO_3^-Na^+)]_{16}$; 3G-O3S32 <> $3G-[Si(CH_2)_3N(CH_2CH_2SO_3^-Na^+)]_{32}$. Pm: Peso molecular (g/mol).

Como en el caso de los DEC+, la primera nomenclatura corresponde con una terminología química más detallada donde se indica la generación del dendrímero y las ramas periféricas de las que consta. El silicio central se corresponde con la generación cero, excepto en el caso de los dendrímeros con núcleo polifenólico, donde la generación cero corresponde al polifenol más los tres silicios adyacentes. Los siguientes silicios representan la generación 1 y así sucesivamente hasta la generación 3. Esto es independiente del número de grupos terminales que posee el dendrímero, ya que una segunda generación puede contener 16 o 24 grupos terminales (Figs. 16-18). En la segunda nomenclatura se muestra la composición química de la molécula, seguida de su peso molecular (Figs. 16-18). Las siglas equivalentes de los tres tipos de DEC- se utilizaron en esta Memoria para un seguimiento más sencillo en todos los experimentos.

El procedimiento de síntesis química de los DEC- 1G-C8; 2G-C16; 3G-C24; 1G-S8; 2G-S16; 3G-S24 y de los DEC- 1G-O3S12; 2G-O3S24; 3G-O3S48 se inscribieron en el año 2010 en la oficina española de patentes y marcas como *Dendrímeros carbosilano y su uso como antivirales* [183] y *Dendrímeros carbosilano con un núcleo polifenólico y su uso como antivirales* [182], respectivamente.

El día del experimento, los DEC- se disolvieron en agua estéril (Braun®) a una concentración de 1 mM agitándolos ligeramente (Fig. 19).



Fig. 19 Solubilidad de los DEC-. El día del experimento, se utilizó un desencapsulador para diluir en agua destilada estéril los DEC- a una concentración de 1 mM.

Solo la tercera generación de los dendrímeros aniónicos con núcleo polifenólico presentó problemas de solubilidad en algunos experimentos.

3.2. AGENTES DE TRANSFECCIÓN COMERCIALES

Se utilizaron dos dendrímeros con un núcleo de poliamidoamina y con grupos amino terminales como agentes de transfección comerciales, donde la unión dendrímero-ácido nucleico se establece de forma electrostática (Fig. 20).

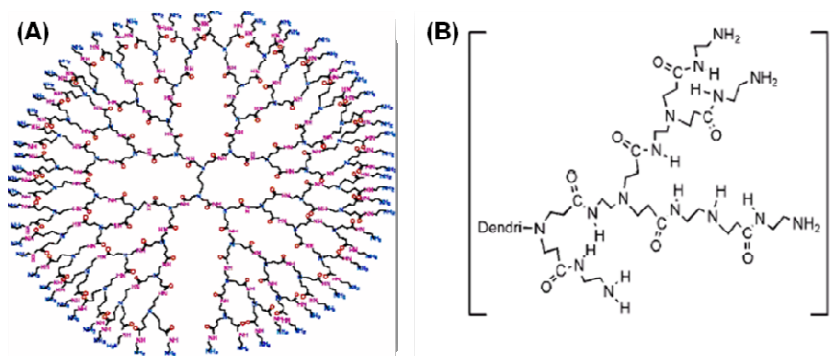


Fig. 20 Dendrímeros catiónicos comerciales. (A) PAMAM de cuarta generación con 64 grupos amino terminales y peso molecular de 14215 g/mol. **(B)** Superfect, dendrímero PAMAM activado de séptima generación con 140 grupos aminos terminales y peso molecular de 35000 g/mol.

La figura 20A representa la estructura completa de un PAMAM G4 (Aldrich Chemical Co[®], Milwaukee, WI) con 64 grupos amino terminales que a pH fisiológico se protonan dando al dendrímero PAMAM una carga neta positiva, aunque también quedan presentes algunos grupos amina sin protonar. El PAMAM G4 se utilizó en exceso molar de 100 a 1 frente al ODN, según lo propuesto por Sato y col. [184]. En la figura 20B se detalla una de las ramas terminales del dendrímero Superfect (Qiagen[®], Crawley, GB), un dendrímero PAMAM de séptima generación activado mediante tratamiento térmico. Se utilizó el ratio de carga propuesto por el fabricante, superior a 10/1 frente al ODN.

También se utilizó Lipofectin® (Invitrogen), un agente de transfección basado en un lípido catiónico utilizado para transfectar células primarias pero que no es compatible con la presencia de suero en el medio de cultivo.

3.3. OLIGONUCLEOTIDOS

Las biomoléculas más utilizadas para terapia génica son copias de ADN complementario obtenidas a partir de ARN mensajero. Éstos, a su vez, provienen de genes que codifican proteínas de interés terapéutico. Se detallan en la tabla 2 las secuencias de los cinco ODN antisentido con carácter inhibidor de la replicación del VIH utilizadas en esta Memoria.

Tabla 2. Descripción de los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de esta Memoria.

ODN	FUNCION	SECUENCIA (5'-3')	BASES
PPT	Antisentido/triple hélice frente a la región PPT (PolyPurine Tract)	TTTTCTTTTGGGGGG	15
TAR	Antisentido frente a la región TAR	GCTCCCGGGCTCGACC	16
GEM91	Antisentido frente a la región GAG (Gene Expression Modulator 91)	CTCTCGCACCCATCTCTCCTTCT	25
SREV	Antisentido frente a la región REV	TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCCTGCCA	28
TARs	Sentido de la región TAR	GGTCGAGCCCGGGAGC	16
Random	No complementario a ningún ARNm	GCCTCACGCGCGCTC	15
Mezcla1	TAR + GEM91	-	-
Mezcla2	TAR + SREV	-	-

Todos los ODN se obtuvieron de Eurogentec S.A. (Bélgica) y se evaluaron frente a distintos genes del VIH. Se recibieron en forma de sal liofilizada y se resuspendieron en agua destilada esteril (Braun®) a la concentración de 1 µg/µL. Se emplearon ODN marcados en el extremo 5' con una molécula de isotiocianato de fluoresceína (FITC) y sus análogos sin FITC, dependiendo del experimento realizado. Se utilizaron tamaños entre 15 y 28 bases (tabla 2) y la naturaleza de los ODNs utilizados fue fosforotioato, donde un azufre se sustituye por un oxígeno no enlazante en la unión fosfodiéster de los ODN (Fig. 21). Esta modificación química garantizó la resistencia de los ODN a la degradación por las ADNasas.

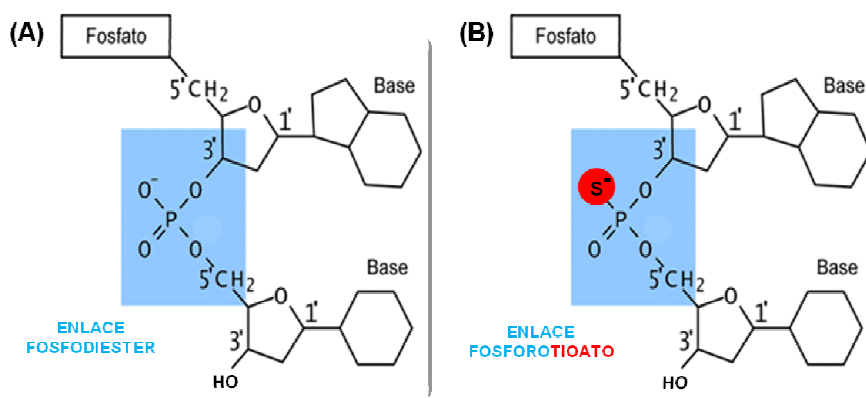


Fig. 21 Oligonucleótidos con grupos fosforotioato. (A) Representación del enlace fosfodiéster entre el grupo fosfato (H₃PO₄) del carbono 5' de un nucleótido y el grupo hidroxilo (-OH) del carbono 3' del siguiente. (B) Representación del enlace internucleotídico modificado por un grupo tiol (-SH), dando lugar al grupo fosforotioato.

3.4. ESTUDIO DE LOS DENDRIPLEXES DEC+/ODN

Se conocía el uso de geles de agarosa para el estudio de la formación de complejos entre los dendrímeros PAMAM+ y ODN marcados isotópicamente [184]. Basados en este tipo de aproximaciones se intentó desarrollar geles de agarosa que permitieran estudiar esta conformación sin la utilización de isótopos radioactivos. Se consideraron diferentes porcentajes de agarosa debido al tamaño pequeño de los ODN ensayados.

En la literatura de dendrímeros PAMAM se describe la necesidad de que el complejo formado presente un exceso de carga positiva para facilitar su unión a las glicoproteínas de la membrana celular, cargadas de forma negativa, iniciándose así el proceso de endocitosis [84]. Por ello los complejos entre los DEC+ y los diferentes ácidos nucleicos se formaron siempre en exceso de número de cargas positivas frente a negativas. La unión electrostática que se establece para la formación del dendriplex (unión dendrímero/oligonucleótido) tiene lugar entre la carga positiva del nitrógeno cuaternizado con yoduro de metilo (todos sus electrones compartidos) en el DEC+ y la carga negativa aportada por el azufre del enlace fosforotioato del ácido nucleico.

Se probaron diferentes ratios de carga para los DEC+ y se estableció el ratio 2/1 de cargas positivas/negativas para todos los complejos formados con los dendrímeros descritos en esta Memoria, obteniéndose una carga neta positiva necesaria tanto para la unión electrostática de todo el ácido nucleico como para la adherencia a la membrana celular. En el caso de indicar un ratio distinto a 2/1, se mantuvo siempre la relación +/- en la nomenclatura.

3.4.1. Formación de los dendriplexes

En todos los ensayos se utilizó un volumen de formación de complejo de 60 μ L (PBS o medio de cultivo RPMI 1640, Gibco). El tiempo de incubación fue siempre de 20 min y a temperatura ambiente, para obtener la formación perfecta del dendriplex. Se denominó “tiempo cero” para los experimentos al final de este tiempo de incubación.

Se añadieron las cantidades correspondientes de DEC+ y ODN para alcanzar la relación de carga neta deseada, generalmente un exceso de carga positiva. Los cálculos se hicieron en base al número de cargas positivas de una molécula de dendrímero y al número de cargas negativas de una molécula de ODN, como se detalla en el siguiente ejemplo:

Calculo de la cantidad de **DEC+ N8** necesario para obtener un dendriplex con ratio **2/1** (+/-) utilizando 1 μM de **ODN GEM91** que será añadido a un pocillo de 500 μL .

Se calcula la cantidad necesaria para tener una concentración de 1 μM de GEM91 en 500 μL de volumen final (volumen de una placa de 24 pocillos), aunque el volumen de mezcla será de 60 μL .

I. Cálculo del volumen de ODN a añadir

$$[\text{GEM91}] = \frac{1 \mu\text{g}/\mu\text{L}}{8112,5 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 10^6 \text{ L}} = 123,3 \mu\text{M} \rightarrow V_{1\mu\text{M}} = \frac{1 \mu\text{M} \times 500 \mu\text{L}}{123,3 \mu\text{M}} = 4,1 \mu\text{L}$$

II. Total de cargas negativas

$$\text{Moléculas GEM91}_{1\mu\text{M}} = 1 \mu\text{M} \times 500 \mu\text{L} \times 6,023 \times 10^{23} = 3,012 \times 10^{14}$$

$$\text{Cargas negativas}_{1\mu\text{M}} = 3,012 \times 10^{14} \text{ moléculas} \times$$

$$\times \frac{25 \text{ cargas negativas del GEM91}}{\text{molécula}} = 7,53 \times 10^{15}$$

III. Total de cargas positivas para ratio 2/1 (+/-)

$$\text{Cargas positivas N8 necesarias} = 2 \times 7,53 \times 10^{15} = 1,51 \times 10^{16}$$

$$\text{Moléculas N8} = \frac{1,51 \times 10^{16} \text{ cargas positivas}}{8 \text{ cargas positivas/molécula de N8}} = 1,89 \times 10^{15}$$

$$\text{Moles N8} = \frac{1,89 \times 10^{15} \text{ moléculas N8}}{6,023 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}} = 3,14 \times 10^{-9}$$

IV. Calculo del volumen de N8 a añadir

$$[\text{N8}] = \frac{3,14 \times 10^{-9} \text{ moles}}{500 \mu\text{L}} = 6,3 \mu\text{M} \rightarrow V_{\text{N8}} = \frac{6,3 \mu\text{M} \times 500 \mu\text{L}}{1\text{mM}} = 3,2 \mu\text{L}$$

Las cantidades a añadir para formar un dendriplex con ratio 2/1 de cargas +/-cargas – son: 4,1 μL de ODN GEM91 + 3,2 μL de DEC+ N8 + 52,7 μL de medio RPMI.

Se ha desarrollado el cálculo explicativo de la formación del dendriplex, pero este cálculo se utilizó de forma más sencilla conociendo la relación de cargas positivas necesarias por molécula de GEM91 (50 +) y utilizando el número de moles del GEM91 (5×10^{-10}):

$$\begin{aligned} &\text{moles de N8 necesarios para ratio 2/1} = \\ &= \frac{50 + (2 \times 25 \text{ cargas} - \text{de GEM91})}{8 + (\text{molécula de N8})} \times 5 \times 10^{-10} = 3,12 \times 10^{-9} \text{ moles} \end{aligned}$$

3.4.2. Electroforesis

Después de elaborar diversos geles con porcentajes de agarosa distintos, se evaluó el dendriplex analizando la capacidad de retención del ODN en geles de agarosa al 3 %. Para este fin, se realizó el siguiente protocolo: 1) pesar 3 g de agarosa (Nusieve® 3:1, Lonza) y adicionar 100 mL de tampón TAE 1X (2,0 M Tris-acetato + 100 mM Na₂EDTA, Pronadisa™); 2) fundir la solución en un horno de microondas; 3) enfriar la solución a 60°C y adicionar bromuro de etidio (BE, 10 mg/mL, Bio-Rad®) hasta una concentración de 0,5 µg/mL y mezclar agitando; 4) verter en el molde de una cámara de electroforesis con un peine apropiado (en algunos casos se utilizó un doble pocillo que permitió cargar hasta 60 µL); 5) quitar el peine cuidadosamente y aplicar en el pocillo 20-50 µL del ODN o dendriplex más 10 µL de tampón de carga 6x (Tampón de carga 6X: 0,25 % azul de bromofenol, 0,25 % xileno cianol y 30 % glicerol en agua). Añadir 5 µL de un patrón de peso molecular de 100 pb (0,1 µg/µL, trackit™, Invitrogen) en otro pocillo; 6) correr la electroforesis a 90 V con la cámara de electroforesis llena de tampón TAE 1X y 7) visualizar las bandas de los fragmentos amplificados en un transiluminador de luz.

Se compararon ODN no fluoresceinados con fluoresceinados, migrando los dos a la misma altura pero aumentando estos últimos la señal de forma considerable. Se evitó así el marcaje isotópico del ODN. Una vez terminada la electroforesis, se tomó una fotografía digital (Kodak DC40, Eastman Kodak Company) de cada gel tras exposición del mismo a luz ultravioleta, utilizando el software del equipo para fotografía de geles. Para la cuantificación de las bandas, se utilizó el programa ImageJ (1.38x, NIH, USA). Los geles se repitieron 3 veces como mínimo y se muestra uno de forma representativa.

3.4.2.1. Dendriplex vs Albúmina

Para evaluar la unión de ODN y dendriplexes a proteínas del plasma, se expusieron los mismos a la presencia de distintas concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich®), medio completo (medio de cultivo RMPI 1640 suplementado con 10 % de STF, L-glutamina 2 mM, 1 % ampicilina, 1 % cloxacilina y 0.32 % gentamicina) o suero humano AB (suero AB).

Se añadió BSA, medio completo o suero AB al dendriplex a tiempo cero hasta alcanzar la concentración deseada en cada ensayo. Se dispensaron en el pocillo del gel 30 µL de la disolución con la mezcla, mientras que el resto del volumen se mantuvo en condiciones de cultivo (CC: 37°C, 5 % CO₂ y 95 % de humedad relativa) el tiempo indicado para cada ensayo previa realización de la electroforesis.

Las distintas mezclas obtenidas se ensayaron para migración del ADN y de proteína en los geles de agarosa descritos en el apartado anterior. Tras tomar la fotografía del gel expuesto a luz ultravioleta, se procedió a su tinción con una solución de colorante azul Paragón al 0,5 % (sal disódica de ácido 8-amino-7-(3-nitrofenilazo)-2-(fenazilo)-1-naftol-3,6-disulfónico, Beckman Coulter®) durante 20 min para evidenciar la presencia de proteínas. Se destiñó finalmente el gel mediante lavados con ácido acético glacial al 10 %, tomándose posteriormente una fotografía con cámara digital.

3.4.2.2. Dendriplex vs Nucleasas

Para evaluar el efecto protector del dendrímero frente a la degradación del ODN o siRNA por las nucleasas, el dendriplex a tiempo cero se expuso a una unidad de ADNasa I o ARNasa (Promega, Madison WI, USA) a 37 °C durante 30 min antes de realizar el ensayo de electroforesis.

3.4.3. Espectrofluorimetría

La espectroscopia de fluorescencia o espectrofluorimetría, utiliza un rayo de luz, normalmente ultravioleta, que excita a los electrones de las moléculas de ciertos compuestos y hace que emitan luz, dando lugar a un espectro de emisión. El grupo de la doctora Bryszewska en la Universidad de Lodz (Polonia) describió mediante técnicas espectrofluorimétricas la interacción de los dendrímeros PAMAM con la albúmina [185-187]. Debido a la gran experiencia del grupo citado, se estableció una colaboración con el Departamento de Biofísica de la Universidad de Lodz para el estudio de las fuerzas de unión existentes entre los DEC+, los ODN y BSA [69].

Los ensayos de espectrofluorimetría se llevaron a cabo fijando una concentración de la molécula (DEC+, ODN, BSA, etc.) en cubeta de cuarzo (Perkin-Elmer 40 LS-50B). La cubeta de 1 cm de longitud de trayectoria se mantuvo en continua agitación en la celda de medida y se adicionó las cantidades necesarias del agente de unión con una micropipeta. El software utilizado fue FLWINLAB y las medidas se llevaron a cabo a 37°C y en tampón fosfato 0.15 M (pH 7.4). Los demás reactivos químicos usados fueron de grado analítico y se utilizó agua destilada doblemente para todas las disoluciones.

Se comprobó que los DEC+ no se excitaron ni emitieron fluorescencia entre 280 y 500 nm. Los ODN marcados con fluoresceína se excitaron a 485 nm y su espectro de emisión se recogió a 516 nm. Para la fluorescencia de la BSA y la albúmina de suero humano (HSA) (Sigma-Aldrich®), se fijó una onda de excitación de 295 nm y el espectro de emisión se recogió entre 305 y 420 nm. Para el BSA marcado con Alexa Fluor 488 (BSA-AF), 487 nm y 520 nm fueron las respectivas longitudes de onda de excitación y emisión. Para la fluorescencia del L-triptófano (Sigma-Aldrich®), la excitación fue de 280 nm y el espectro de emisión fue recogido entre 300 y 440 nm. Para los experimentos con ácido 1 anilinaftaleno-8-sulfónico (ANS, Sigma-Aldrich®), la excitación se estableció en 370 nm y el rango de emisión entre 400 y 600 nm. Las anchuras de corte de excitación y emisión fueron 10 nm y 5 nm en todos los casos, respectivamente. ANS y L-triptófano se disolvieron en PBS a las concentraciones de 100 µM y 50 µM, respectivamente.

3.4.3.1. Estudio de las interacciones DEC+/ADN

3.4.3.1.1 Polarización de la fluorescencia

La polarización de la fluorescencia (P_{ABS}) de los ODN fluoresceinados, así como de BSA y BSA-AF, se calculó con la siguiente fórmula:

$$P_{ABS} = \frac{I_{VV} - G \times I_{VH}}{I_{VV} + G \times I_{VH}}, \quad (1)$$

donde I_{VV} e I_{VH} son la componente vertical y horizontal de la luz emitida por un fluoróforo excitado por una luz vertical plana polarizada. El factor G se calculó de la ecuación

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}, \quad (2)$$

donde I_{HV} e I_{HH} son la componente vertical y horizontal de la luz emitida por un fluoróforo excitado por una luz horizontal plana polarizada.

La polarización relativa (P , como porcentaje con respecto al control) se calculó como

$$P = \frac{P_{ABS}}{P_{ABS}^0} \times 100 \%, \quad (3)$$

donde P_{ABS} y P_{ABS}^0 son la polarización de fluorescencia de los ODN fluoresceinados, BSA o BSA-AF en presencia o ausencia de los DEC+, respectivamente.

3.4.3.1.2 Ensayo de bromuro de etidio.

Se utilizó BE y ADN de timo de ternera (ADN_{TT} , Sigma-Aldrich®) a una concentración de 1 y 3 $\mu\text{g/mL}$ en tampón fosfato 0,15 μM (pH 7,4), respectivamente. El espectro de fluorescencia del BE puro y en presencia de ADN_{TT} fue medido antes y después de la adición de los DEC+. Se fijó una onda de excitación de 477 nm y el espectro de emisión se recogió entre 500 y 800 nm. Bajo estas condiciones, la emisión máxima de fluorescencia del BE (618 nm) se correspondió con 100 unidades relativas

(u.r.) del dispositivo. La intensidad de fluorescencia del BE/ADN_{TT} antes y después de la adición de los DEC+ se midió a $\lambda_{\text{max}} = 604$ nm, con unas anchuras de corte de excitación y emisión de 14,0 y 8,0 nm, respectivamente. Se comprobó que los DEC+ no interaccionaron con el BE en dichas condiciones.

Estos datos se utilizaron para calcular la aparente constante de unión (asociación) entre los DEC+ y el ADN_{TT} ($K_a^{\text{DEC+}}$), usando dos ecuaciones diferentes. La primera

$$K_a^{\text{DEC+}} = K_a^{\text{BE}} \times \frac{[\text{BE}]_0}{[D]_{50}}, \quad (4)$$

donde K_a^{BE} es la constante de asociación entre BE y ADN_{TT}, $[\text{BE}]_0$ es la concentración total de BE en solución y $[D]_{50}$ es la concentración que genera una disminución de la intensidad de fluorescencia inicial del complejo BE/ADN_{TT} del 50 % [188].

La segunda ecuación

$$\frac{1}{K_a^I} = \frac{IC_{50}}{1 + L_T \times K_a^L}, \quad (5)$$

donde K_a^I es la constante de asociación del inhibidor ($=K_a^{\text{DEC+}}$), IC_{50} es la concentración del inhibidor (I = DEC+) necesaria para desplazar un 50 % al ligando (BE), L_T es la concentración total del ligando (BE) y K_a^L es la constante de asociación para el ligando ($=K_a^{\text{BE}}$).

De las ecuaciones (4) y (5) se obtiene que

$$[D_{50}] = IC_{50} \quad (6)$$

En un tampón fosfato de 0,2 M (pH 7,4), K_a^{BE} fué $1,70 \pm 0,04 \times 10^5$ (M)⁻¹ [188]. Para calcular las constantes, los datos de las gráficas se modificaron de tal forma que los cambios en la intensidad de fluorescencia del complejo BE/ADN_{TT} cuando los dendrimeros se añadieron fué

$$F^{rel} = \frac{F^{BE/ADN_{TT}} - F^{BE}}{F_0^{BE/ADN_{TT}} - F^{BE}}, \quad (7)$$

donde $F^{BE/ADN_{TT}}$ y $F_0^{BE/ADN_{TT}}$ son la fluorescencia del complejo BE/ADN_{TT} en presencia y ausencia del DEC+, respectivamente, y F^{BE} es la fluorescencia del BE puro.

3.4.3.2. Estudio de las interacciones DEC+/BSA

Se realizó mediante el análisis de Stern-Volmer (apartado 3.4.3.3.)

3.4.3.3. Análisis de Stern-Volmer

La principal razón para estudiar la fluorescencia intrínseca de las proteínas estriba en las posibilidades que ofrece para obtener información sobre la conformación espacial de la molécula. Esto es posible debido a que la fluorescencia de los únicos fluoróforos intrínsecos de las proteínas (triptófano, tirosina y fenilalanina, en orden decreciente de fluorescencia) es muy dependiente del medio (es decir, disolvente, pH, de la presencia de pequeñas moléculas o de grupos vecinos de la propia proteína y de la presencia de un agente de extinción o extintor). El proceso de extinción de la fluorescencia o *quenching* consiste en un decaimiento de la intensidad de la emisión de fluorescencia. La accesibilidad de determinados compuestos sobre una molécula de proteína puede ser medida por el uso de un extintor que perturbe el grupo fluoróforo de dicha proteína (en la práctica, la fluorescencia más estudiada es la del triptófano). Esta extinción ocurre por diferentes mecanismos: por colisión o dinámico, estático, por transferencia de energía y mediante reacciones de transferencia de carga.

La interacción DEC+ y BSA tiene lugar por un mecanismo de colisión o dinámico:

$$\frac{F}{F_0} = 1 + K_{sv}[Q], \quad (1)$$

donde F_0 y F son, respectivamente, la intensidad de fluorescencia en ausencia y en presencia de un extintor, K_{sv} es la constante de dinámica de extinción (también llamada constante de Stern-Volmer) y $[Q]$ es la concentración del extintor.

El experimento se realizó con una disolución de 5 μM de BSA en tampón fosfato 0.15 M (pH 7.4) y se utilizó un agente de extinción de fluorescencia neutro (acrilamida) y dos iónicos (KI y CsCl). Para KI y CsCl, I^- y Cs^+ actuaron como extintores respectivamente. Se añadieron alícuotas crecientes de los extintores a la concentración constante de BSA. Las soluciones stock de acrilamida, KI y CsCl fueron 1, 5 y 10 M, respectivamente. Se utilizó 0,1 mM de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ en la solución de KI para prevenir la oxidación de I^- a I_3 . La intensidad de fluorescencia se recogió a 350 nm y se excitó a 295 nm. Las anchuras de corte de excitación y emisión fueron 3.4 nm y 10 nm, respectivamente. Los datos de extinción de la fluorescencia se midieron para BSA nativa y BSA más 0,1 mM del DEC+.

La ecuación (7) asume una relación lineal entre $\frac{F}{F_0}$ y $[\text{Q}]$, con una pendiente K_{sv} . Las constantes de Stern-Volmer expresan la accesibilidad estérica del extintor al cromóforo [188].

3.4.3.4. Análisis de Scatchard-Klotz

Este análisis consiste en una doble valoración de fluorescencia y se determinaron por esta técnica la constante de unión (K_b) y el número de centros de unión por molécula (n) para DEC+. Shcharbin y col. desarrollaron esta técnica con dendrímeros PAMAM en 2005 [189]. En la primera valoración, concentraciones crecientes del agente de unión (DEC+) se añadieron a una concentración constante de ANS y se determinó la máxima intensidad de fluorescencia (F_{max}). Esta corresponde al estado donde todas las moléculas de ANS están rodeadas de DEC+. La máxima fluorescencia del ANS dividido por su concentración da la intensidad específica de fluorescencia de la prueba de unión (F_e):

$$F_e = \frac{F_{\text{max}}}{C_{\text{ANS}}^1}, \quad (1)$$

donde C_{ANS}^1 es la concentración de ANS durante la primera valoración.

En la segunda valoración, el DEC+ tiene una concentración C_D . Concentraciones crecientes de ANS (C_{ANS}^2) se añadieron al DEC+ y se midió la intensidad de fluorescencia (F). La concentración de ANS incorporada al DEC+ se calculó de la forma siguiente:

$$C_{ANS}^{unida} = \frac{F}{F_e}, \quad (2)$$

calculándose la concentración de ANS libre como:

$$C_{ANS}^{libre} = C_{ANS}^2 - C_{ANS}^{unida} \quad (3)$$

La constante de unión (K_b) y el número de centros de unión en la solución (N) pueden ser determinados por la gráfica:

$$\frac{1}{C_{ANS}^{unida}} = \frac{1}{K_b \cdot N \cdot C_{ANS}^{libre}} + \frac{1}{N} \quad (4)$$

La región inicial de la curva es una línea recta. Se modifica la Eq. (4) reemplazando N por el número de centros de unión por molécula de DEC+ (n):

$$n = \frac{N}{C_D} \quad (5)$$

Así, la Eq. (4) queda:

$$\frac{C_D}{C_{ANS}^{unida}} = \frac{1}{K_b \cdot n \cdot C_{ANS}^{libre}} + \frac{1}{n} \quad (6)$$

Y las constantes se calcularon en la parte lineal de la gráfica $\frac{C_D}{C_{ANS}^{unida}}$ vs $\frac{1}{C_{ANS}^{libre}}$

3.4.3.5. Análisis estadístico

Todos los datos del apartado de espectrofluorimetría (3.4.3.) se expresaron como la media \pm error estándar de la media de 6 experimentos independientes. Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa Origin 7.0 (OriginLab Corp., USA). Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para asegurar la distribución normal de los resultados y se analizaron los resultados mediante el test de Student-Fischer.

3.4.4. Incubación de dendrímero y dendriplex con distintos cultivos primarios y líneas celulares establecidas

Para los ensayos de biocompatibilidad, transfección o inhibición de la replicación del VIH, los dendrímeros o dendriplexes se incubaron con diferentes tipos celulares en el medio de cultivo correspondiente a cada caso. El medio de cultivo completo (MCC) utilizado para cada línea celular se clasificó en cinco tipos: MCC1 (RPMI 1640, Biochrom AG[®]), MCC2 (McCoy's 5A, Biochrom AG[®]) y MCC3 (DMEM, BiochromAG[®]) suplementados con STF (inactivado por calor) al 10 %, L-glutamina a 2 mM (LONZA, Bélgica), ampicilina y cloxacilina al 1 % y gentamicina al 0.32 % (Laboratorios NORMON, España). MCC4 (RPMI 1640, Biochrom AG[®]) suplementado con STF (inactivado por calor) al 10 %, L-glutamina a 2 mM, HEPES a 10 mM, piruvato sódico a 1 mM, Glucosa a 4.5 g/L, ampicilina y cloxacilina al 1 % y gentamicina al 0.32 %. MCC5 (KSFM kit, GIBCO-BRL 17005-075) medio de cultivo sin suero suplementado con hormona del crecimiento humano (hrEGF, 0.1 ng/L), extracto de pituitaria bovina (0.05 mg/mL) y CaCl₂ (0.4 mM).

Los dendriplexes formados en 60 µL de RPMI y a tiempo cero, se mezclaron con 100 µL de MCC. Los 160 µL se añadieron a las células cultivadas en 340 µL de medio completo, dando un volumen final de 500 µL. Las células se incubaron con dichos complejos, con una mezcla de igual volumen que contenía el ODN solo, con una mezcla que contenía DEC+ solo, o con una mezcla utilizada como control negativo (vehículo) que contenía solamente RPMI + MCC. Las células y/o el sobrenadante se recogieron a distintos tiempos según el diseño del experimento, para su análisis por citometría de flujo, microscopía confocal o para la cuantificación por un inmunoensayo enzimático (ELISA p24. INNOTEST[™] HIV antigen mAB, Innogenetics[®]). Se procedió de manera similar con los dendrímeros comerciales que se utilizaron como controles, PAMAM G4 y Superfect.

Los dendrímeros aniónicos se añadieron en volúmenes de 10 µL a 50 µL, dependiendo del experimento, y se utilizó siempre como vehículo PBS. Se añadió el mismo volumen de cada uno de los compuestos utilizados.

3.5. CÉLULAS

Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP): La sangre se obtuvo de donantes adultos o de cordón umbilical de neonatos sanos, tras obtener el consentimiento informado del donante o de la madre. Dicha sangre se diluyó con el mismo volumen de PBS y se procedió a su centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Isopaque®). Tras dicha centrifugación se recuperó el halo que contenía las CMSP y se procedió a dos ciclos de lavado-centrifugación con PBS. Las CMSP resultantes se cultivaron en MCC1 en diferentes formatos de placa (6, 24 o 96 pocillos, según el diseño del experimento. Costar, Corning Inc.) en CC. Dos días antes del tratamiento con los ODN o con los dendriplexes, las CMSPs fueron activadas con fitohemaglutinina (PHA, Remel) a 2 µg/mL y con interleucina-2 (IL-2, Bachem) a dosis de 50 UI/mL, siendo la concentración celular aproximada de 5×10^6 /mL. En el día del tratamiento, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron a una concentración de $2,5 \times 10^5$ células por cada 340 µL. Sin embargo, y dado que el volumen final cuando posteriormente se añadieron los respectivos tratamientos sería de 500 µL, se añadió IL-2 para mantener la activación celular durante el transcurso del experimento a una dosis de 20 UI/mL calculada en base a los 500 µL.

Para los ensayos de toxicidad, se utilizaron placas de 96 pocillos, con una concentración de células de 1×10^5 en 200 µL. Se mantuvieron estas concentraciones y volúmenes para todas las células en suspensión utilizadas en esta Memoria, salvo situaciones específicas.

MT-2: Línea celular de leucemia de células T con ADN de HTLV-1 integrado. Se obtuvieron a través de *AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH*: MT-2 donación del Dr. Douglas Richman. Se cultivaron en MCC1 en diferentes formatos de placa (6, 24 o 96 pocillos, según el diseño del experimento. Costar, Corning Inc.) en CC.

SupT1: Línea celular de linfoma no Hodgkin de células T adquiridas a través del *American Type Culture Collection* (ATCC). Se cultivaron en MCC5 en diferentes formatos de placa (6, 24 o 96 pocillos, según el diseño del experimento. Costar, Corning Inc.) en CC.

M8166: Línea celular linfoide clonada de C8166 para aumentar la susceptibilidad de formar sincitios por el VIS. Se obtuvieron a través de *AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH*: M8166 donación del Dr. P. Clapham. Se cultivaron en MCC1 en diferentes formatos de placa (6, 24 o 96 pocillos, según el diseño del experimento. Costar, Corning Inc.) en CC.

HEC-1A: línea celular endometrial humana, derivada de un adenocarcinoma humano de endometrio adquiridas a través del ATCC y se cultivaron en MCC2 en placas de 24 o 96 pocillos o placas *transwell* de 12 pocillos con soporte permeable de policarbonato de 0.4 µm de poro (Costar, Cambridge, MA), en CC.

VK2/E6E7: línea celular epitelial vaginal humana, transducida con el vector viral LXS_N-16E6E7. Se obtuvieron del ATCC y se cultivaron en MCC5 en placas de 24 o 96 pocillos o placas *transwell* de 12 pocillos con soporte permeable de policarbonato de 0.4 µm de poro (Costar, Cambridge, MA), en CC.

P4-R5 MAGI: línea celular que expresa establemente el receptor CD4 y el gen reportero LacZ que se encuentra bajo el control del LTR del VIH-1. Esta línea es susceptible de infección por el VIH X4 o R5 trópicos así como por el VIS. La expresión de la proteína Tat viral promueve la transcripción del gen LacZ con actividad β-galactosidasa. Se obtuvieron de *AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH*, donación del Dr. Julie Overbaugh. Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos, en MCC3 y CC.

Monocitos: Se realizó una separación de CMSP por gradiente de densidad como se ha descrito anteriormente. Los monocitos se obtuvieron por separación inmunomagnética con anticuerpos monoclonales anti-humano CD14 (MicroBeads) mediante separación en columnas (MACS[®], Miltenyi Biotec, Alemania). Las CMSP resultantes se cultivaron en MCC1 en diferentes formatos de placa (6, 24 o 96 pocillos, según el diseño del experimento. Costar, Corning Inc.) en CC. **Células Dendríticas (CD):** Los monocitos purificados se resuspendieron en medio completo en placa de fondo plano de 6 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/pocillo. Se cultivaron con 50 ng/mL rh GM-CSF y 20 ng/mL rh IL-4 (ImmunoTools, Alemania), en CC. Se añadió medio fresco completo a las células inmaduras (CDi) con 50 ng/mL rh GM-CSF y 20 ng/mL rh IL-4 a las 72 h. Se maduraron las células a los 6 días con 20 ng/mL LPS (Sigma-Aldrich[®])

durante 48 h (CDm). **Macrófagos (MΦ)**: Los monocitos purificados se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10 % de suero humano AB, 2 mM L-glutamina y antibióticos (1 % cloxaciclina, 1 % ampicilina y 0.32 % gentamicina) en placa de fondo plano de 6 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/pocillo. Se cultivaron con 50 ng/mL rh M-CSF y se añadió medio fresco con 50 ng/mL rh M-CSF al tercer y sexto día. Las células se recogieron entre el séptimo y octavo día.

U87MG (línea de astroglioma humano, ATCC), **SK-N-MC** (línea celular de neuroblastoma, ATCC), **JEG-3** (línea celular trofoblástica transformada HTB 36, ATCC) y **K562** (línea celular de leucemia mieloide crónica, ATCC) se utilizaron para los ensayos de toxicidad de los DEC+. Se cultivaron en placas de 96 pocillos, en MCC4 y en CC.

Con el objetivo de comprobar que las células eran viables y no estaban contaminadas por micoplasma, los sobrenadantes de las distintas líneas celulares utilizadas en esta Memoria se evaluaron cada 4 meses mediante PCR cuantitativa a tiempo real (*kit MycoSensor QPCR*, Agilent Technologies®), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6. ESTUDIO DE LAS POBLACIONES CELULARES POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para el estudio de las diferentes poblaciones celulares, se realizaron tinciones con anti-CD45 (antígeno panleucocitario), anti-CD3 (receptor de linfocitos T), anti-CD4 (linfocito T helper), anti-CD8 (linfocito T citotóxico), anti CD-19 (linfocito B) y anti-CD14 (monocito) de Beckman-Coulter®. Se emplearon para comprobar la normalidad en la composición fenotípica de las CMSP obtenidas por gradiente de Ficoll y para evaluar la pureza de las poblaciones obtenidas tras separación inmunomagnética. El proceso de tinción incluyó el lavado de las células a marcar con PBS, la incubación durante 20 min a temperatura ambiente con el monoclonal deseado y el lavado posterior de las mismas 2 veces con PBS. Las células que no se analizaron inmediatamente, se fijaron con paraformaldehído al 3 %. En todos los experimentos de citometría se incluyó un control negativo (no tratado) y un control isotópico de cada color. Se incluyeron además

controles adicionales de compensación previamente a cada citometría (mezclas de células marcadas y no marcadas para comprobar la eficacia del marcaje y diferenciar claramente las poblaciones positivas de las negativas, controles positivos, etc). Todas las muestras se adquirieron en un citómetro Beckman-Coulter® de 4 colores y se analizaron mediante el software EPICs® de Beckman-Coulter.

3.6.1. Estudio de internalización del ODN en CMSP de neonatos y adultos por citometría de flujo

Se eligió el ODN TAR-FITC a una concentración de 1 μ M. Se combinó el uso de la citometría de flujo con el conteo de células por microscopía confocal (apartado 3.7.). Mediante esta técnica se evaluó la viabilidad celular y la exclusión de las células muertas con tinción de yoduro de propidio (10 mg/mL, Sigma-Aldrich®). Los marcajes de linfocitos y monocitos (anti-CD4-FITC y anti-CD14-PC5, respectivamente) se realizaron como se indicó previamente. Se llevó a cabo un lavado con tampón de glicina ácida para eliminar el ODN pegado a la membrana celular. Se utilizaron CMSP no tratadas como control en todos los casos y el ensayo se repitió con CMSP de 3 adultos y 3 neonatos, obtenidas por separación inmunomagnética (apartado 3.5.). Las CMSP se estimularon durante 48 h con 2 μ g/mL de PHA y 50 UI/mL de IL-2, y los monocitos utilizados en los ensayos con CMSP activadas correspondían a las células adheridas al plástico tras dos días de estimulación (selección de CD14 positivas en el análisis).

3.6.2. Macrófagos y células dendríticas derivadas de monocito

Los marcadores de M Φ , CDi y CDm respectivamente se analizaron mediante un citómetro Beckman-Coulter® de 4 colores y se utilizó el software EPICs® de Beckman-Coulter®. Los marcadores de superficie utilizados fueron: anti-CD80 y anti-CD83 (Beckman-Coulter®) marcados en FITC. Anti-CD1a, anti-HLA-DR y anti-CD86 (Beckman-Coulter®) y anti-CCR7 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) marcados en PE. Anti-HLA-DR (Beckman-Coulter®) marcado en ECD. Anti-CD14, anti-CD80 (Beckman-Coulter®) y anti-CD86 (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ, USA) marcado en PC5. Se utilizó un panel con los marcadores CD80, CD83, CD86, HLA-DR y CCR7 para comprobar la madurez de las CD a los 7 días de cultivo.

3.7. MICROSCOPIA CONFOCAL

Esta técnica se utilizó para la visualización de las células y los ODN fluoresceinados en los ensayos de transfección. Después de las incubaciones con las mezclas conteniendo ODN fluoresceinados, dendriplexes, dendrímeros o RPMI, se realizó el siguiente protocolo para la posterior adquisición de imágenes en el microscopio de fluorescencia convencional o en el microscopio confocal.

Las células se pegaron a un portaobjetos de cristal con pocillos de 30 mm de diámetro mediante el uso de fibronectina (Sigma-Aldrich®) o poli-L-lisina (PLL, Sigma-Aldrich®). Los lavados se realizaron con PBS-BSA 1 % (PBS con BSA al 1 %). El porta se situó en una cámara húmeda (placa petri con papel de filtro humedecido con agua). El porta se situó sobre el papel húmedo y se procedió de la siguiente forma: 1) añadir 30 µL de PLL a cada pocillo del porta e incubar a 37°C 1 h; 2) retirar el exceso de PLL y lavar 1 vez; 3) lavar las células, 1×10^5 células por punto y resuspender en 30 µL de PBS; 4) opcional: marcar durante 1 min con azul tripán (Sigma-Aldrich®) al 0,8 % y lavar para observar posteriormente las células viables; 5) dispensar sobre cada pocillo del porta e incubar durante 1-2 h a 37°C; 6) fijar las células con paraformaldehído (PFA) 3 % durante 10 min a temperatura ambiente; 7) lavar 2 veces y si no se realiza el marcaje el mismo día en que se fijaron las células al porta guardar la preparación en la cámara húmeda a 4°C; 8) añadir 30 µL de anticuerpo primario anti-CD45 IgG1(κ) de ratón anti-humano (BD®) e incubar 20 min a temperatura ambiente. Dilución del anticuerpo 1/20; (10 veces más concentrado que para Western-blot); 9) lavar 2 veces; 10) añadir 30 µL de anticuerpo secundario de cabra anti-ratón anti IgG-IgM (cadenas pesadas y ligeras) conjugado en Texas-Red (Jackson ImmunoResearch®) e incubar 30 min a temperatura ambiente de 20-22°C. Dilución del anticuerpo 1/130; 11) lavar 2 veces; 12) añadir 10 µL de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, colorante fluorescente que se une fuertemente al ADN. Vysys™) e incubar 10 min a temperatura ambiente; 13) lavar 2 veces; 14) añadir una gota de medio de montaje anti-Fading (destinado a proteger la muestra frente al deterioro causado por la exposición a los láseres del microscopio, DAKO®). Hasta el momento de observar las muestras al microscopio, se guardaron las preparaciones en la cámara húmeda a 4°C protegidas de la luz.

Variaciones: En el caso de los monocitos, en el punto 8 del protocolo se añadió anti-CD14 marcado en Ficoeritrina (PE) y el proceso se realizó como sigue en el punto 11; para CD se utilizó el marcador nuclear DRAQ5TM (Biostatus Limited, UK).

El día del ensayo, se procedió a la observación y captura de imágenes mediante un microscopio confocal Leica TCS SP2[®] utilizando distintas líneas de excitación (405, 488 y 514 nm), además del objetivo para microscopía diferencial de contraste de interferencia (DIC). Tras la captura de imágenes se procedió a su análisis utilizando el *software* de Leica[®].

Se eligió el ODN TAR-FITC para realizar el estudio de la internalización del ODN a una concentración de 1 μ M en CMSP de neonatos y adultos por microscopía. Aproximadamente se utilizaron en cada punto 200 células tratadas con azul tripán para excluir las células dañadas. Se realizó un lavado con tampón de glicina ácida para evitar la confusión al contar ODN pegado a la membrana celular. Se utilizaron CMSP no tratadas como control en todos los casos y el ensayo se repitió con CMSP de 3 adultos y 3 neonatos, obtenidas por separación inmunomagnética (apartado 3.5.). Las CMSP se estimularon durante 48 h con 2 μ g/mL de PHA y 50 UI/mL de IL-2.

3.8. VIABILIDAD CELULAR

Los protocolos de trabajo de las técnicas empleadas en esta Memoria para caracterizar la biocompatibilidad de los DEC+ en diferentes líneas celulares y cultivos primarios se describen a continuación. Todos los ensayos se realizaron siempre por triplicado y al menos dos ensayos independientes cada vez. Los porcentajes de viabilidad celular se expresaron siempre con respecto al control de células no tratadas.

3.8.1. Tinciones con azul tripán

Para evaluar de manera rápida y sencilla el estado de las células se preparó una solución con azul tripán (Sigma-Aldrich®) al 0,8 %. Este colorante azoico se utiliza para discriminar entre células con las membranas intactas (viables, negativas para azul tripán) o membranas dañadas (no viables, positivas para azul tripán). Las células se centrifugaron y se decantó el sobrenadante; tras resuspender el sedimento celular, se trató con la solución de azul tripán durante 1 min, procediéndose a una centrifugación y un lavado posterior con PBS dos veces. Las células se observaron bajo microscopía óptica y se contaron las positivas para la presencia de azul tripán en relación con el porcentaje de células negativas. Para ello se eligió un campo amplio con al menos 100 células.

3.8.2. Marcajes con Anexina-V-PE y 7-AAD

Mediante la técnica de citometría de flujo se evaluó la presencia de células apoptóticas o necróticas en presencia de los DEC+. Se utilizó un kit de Beckton-Dickinson® (BD) para el marcaje combinado o por separado con anexina V marcada con ficoeritrina (anexina-V-PE) y/o 7-aminoactinomicina D (7-AAD). Se siguieron las recomendaciones del kit en ambos casos (destacar la incubación de las células con 3-5 µL de anexina-V-PE en una solución rica en calcio, necesario para la unión de la anexina-V-PE a las fosfatidilserinas traslocadas al exterior durante el proceso de apoptosis). Las citometrías incluyeron controles negativos, controles isotípicos para ficoeritrina y controles positivos de apoptosis (células tratadas con luz ultravioleta durante 15 min).

Se elaboraron paneles específicos de cada población celular para su estudio. Se dibujó una región alrededor de las células con tamaño (*Forward*, FW) y complejidad (*Side*, SD) correspondiente a células en apoptosis-necrosis y otra alrededor de las células con FW y SD correspondiente a células vivas. Se compararon los porcentajes de células presentes en cada puerta.

3.8.3. Marcaje con DAPI

Para evaluar el estado de los núcleos celulares mediante inmunofluorescencia o microscopía confocal, se utilizó este colorante fluorescente (apartado 3.7.).

3.8.4. Ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa

Se utilizó el kit *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay* (Promega) para evaluar el daño en la superficie de la membrana celular debido a la presencia de los distintos grupos periféricos catiónicos y aniónicos de los DEC+ y DEC-, respectivamente. La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima que se libera en el citoplasma debido a la lisis celular. El ensayo de liberación de LDH, por lo tanto, es una medida de la integridad de la membrana, que se basa en la oxidación de LDH a piruvato y la reducción de sales de tetrazolio a cristales de formazán por el piruvato.

Se dispensaron en placa de 96 pocillos de fondo redondo 1×10^5 células/pocillo en un volumen de 100 μL del correspondiente medio completo de cada tipo celular y se añadió el dendrímero en un volumen de 100 μL , para obtener un volumen final en el pocillo de 200 μL . Las células se incubaron en CC a distintos tiempos y se procesaron según las instrucciones del fabricante para la obtención de la citotoxicidad según la fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{(\text{Células tratadas con dendrímero/dendriplex}) - (\text{Control})}{(\text{Células con tritón X} - 100 \text{ al } 0.2 \%) - (\text{Control})} \times 100$$

donde el control representó las células en su correspondiente medio completo.

3.8.5. Ensayo de reducción de sales de tetrazolio

Esta técnica se utilizó para evidenciar efectos deletéreos sobre el metabolismo celular. Es un ensayo colorimétrico basado en la capacidad selectiva de las células viables para reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich®) en cristales insolubles de formazán. Tras el tiempo de incubación de las

distintas poblaciones celulares con diferentes concentraciones de dendrímeros en placa de 96 pocillos (1×10^5 células/pocillo) y con 3 pocillos como control positivo de inactividad celular (20 % de dimetil sulfóxido, DMSO, Sigma-Aldrich®). El sobrenadante que contenía dendrímero se retiró y se sustituyó por 200 µL de un medio de cultivo sin suero ni rojo fenol (Opti-MEM®). Además de los 200 µL de Opti-MEM®, se añadieron 20 µL de MTT en PBS a una concentración de 5 mg/mL (concentración final en pocillo de 0,5 mg/mL). Después de 3-4 h de incubación en CC, se procedió a la centrifugación de la placa a 2000 r.p.m. 10 min y a la posterior retirada del sobrenadante con el exceso de MTT que no reaccionó. Los cristales de formazán se observaron al microscopio de contraste de fase y se disolvieron posteriormente con 200 µL de DMSO. La placa se agitó a 700 r.p.m. en un agitador Eppendorf® para asegurar la correcta disolución de dichos cristales. La concentración de formazán se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm con una referencia de 690 nm. El espectrofotómetro se calibró a 0 utilizando Opti-MEM® sin células. La viabilidad celular relativa (%) respecto del control (células sin tratar) se calculó en base a la fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{[A]}{[A]_0} \times 100,$$

donde A representa el valor del pocillo evaluado y A_0 el valor del pocillo control.

3.8.6. Ensayo de hemólisis

Los hematíes se obtuvieron tras ser separados de las CMSP mediante el mismo gradiente de Ficoll detallado anteriormente. Los mismos se diluyeron adecuadamente en PBS hasta poder ser visualizados de forma individualizada. Después se resuspendieron en 500 µL de PBS y se cultivaron en placa de 24 pocillos (3×10^5 hematíes/pocillo). Como control positivo de lisis se utilizaron células tratadas con Tritón X-100 al 0,2 %. Como control negativo se utilizaron las células tratadas con PBS. Los hematíes se incubaron con distintas concentraciones de dendrímero. Se evaluó la presencia de hemaglutinación, número de células y liberación de hemoglobina a la hora mediante la recogida de 100 µL de sobrenadante y medición de absorbancias por espectrofotometría a una longitud de onda de 550 nm y 690 nm.

3.8.7. Ensayo linfoproliferativo

Para evaluar la capacidad mitogénica de los dendrímeros, se realizó un ensayo de proliferación celular. Se preparó el experimento por triplicado en placa de 96 pocillos de fondo plano (1×10^5 CMSP/200 μ L de MCC1). El experimento incluyó un control negativo de proliferación (células sin tratar), pocillos tratados con distintas concentraciones de dendrímero y otro control positivo de proliferación (2 μ g/mL de PHA). Tras 4 días de incubación en CC, se procedió a la retirada del sobrenadante y a la preparación de las muestras para el Kit de proliferación celular de BrdU (*Bromodeoxyuridine Cell Proliferation Assay*, Chemicon International). Se realizó el protocolo indicado por el kit y se obtuvo la incorporación de BrdU en ADN de nueva síntesis. El porcentaje de proliferación respecto al control se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ Proliferación} = \frac{[A]}{[A]_0} \times 100,$$

donde A representa el valor del pocillo evaluado y A_0 el valor del pocillo control.

Esta técnica se empezó a utilizar en el año 2007, siendo los primeros experimentos de capacidad mitogénica con Timidina Tritiada (preparada con MCC1 pero con suero AB al 10 % y Timidina 1/100). La placa se filtró utilizando un Harvester, pasando su contenido a un filtro, el cual se dejó secar durante 16 h. Tras este periodo, se procedió a la fusión por calor de una lámina de Metilex[®] conteniendo medio de centelleo, y se procedió a su lectura en gammacámara para evaluación del número de cuentas por minuto.

3.9. ENSAYOS DE INHIBICIÓN VIRAL

3.9.1. Preparación y utilización de virus

VIH-1_{NL4-3} es una cepa viral X4 de laboratorio establecida y se utilizaron células MT-2 para la expansión del virus. Se lavaron 2×10^6 MT-2 dos veces con medio completo

y se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL a una concentración de 2×10^6 células/mL en medio completo. Posteriormente, se añadió VIH-1_{NL4-3} a una concentración de 1 partícula por célula o lo que es lo mismo, 1 *MOI*. (multiplicidad de infección). Se cultivaron las MT-2 con el VIH-1_{NL4-3} durante 2 h en CC, agitando el cultivo cada 15-30 min. Finalmente se lavaron los cultivos (células-virus) dos veces para retirar el virus no integrado en el genoma celular. Las células se transfirieron a un pocillo de p6 en un volumen de 3-4 mL. Se dejó en cultivo durante 2-3 días y se observó la presencia de sincitios en el pocillo. Cuando la presencia de sincitios alcanzó un 80-90 % de producción, se añadieron 12 mL de medio completo con 20×10^6 MT-2 y se dispensaron en placa petri. A los 2-3 días, se centrifugó todo el volumen y se recogió el sobrenadante. Se añadieron 12 mL de medio completo con 20×10^6 MT-2 a las células anteriores (MT-2 infectadas) y se dispensaron en placa petri. Este proceso se repitió 3 veces. El sobrenadante se alicuotó y se almacenó en un tanque de nitrógeno líquido, para posteriormente ser titulado. La titulación se realizó en la línea celular MT-2. Para ello se cultivaron 2×10^4 células MT-2 con medio completo en placas de 96 pocillos y se añadieron 40 µL de la preparación viral a distintas concentraciones, para lo que se realizaron las correspondientes diluciones. Se dispusieron las diluciones por octuplicado y se mantuvieron en CC durante una semana. Transcurrido este tiempo se procedió a la lectura de la titulación por visualización del efecto citopático. El título se calculó aplicando la fórmula de Spearman-Kärber. También se tituló mediante cuantificación de antígeno p24 por ELISA (INNOTESTTM HIV antigen mAB, Innogenetics[®]) según las instrucciones del fabricante y se estableció la relación partículas infectivas por mL y µg de virus por mL.

VIH-1_{BaL} es una cepa viral R5 de laboratorio establecida y el proceso de expansión del virus se realizó de forma similar al VIH-1_{NL4-3}, pero se utilizaron CMSP. El sobrenadante se alicuotó y se almacenó en un tanque de nitrógeno líquido, para posteriormente ser titulado. El aislado VIH-1_{BaL} se tituló mediante cuantificación de antígeno p24 por ELISA. Para asegurar la pureza del virus, las alícuotas descongeladas se filtraron a través de filtros de 0.22 µm antes de la cuantificación.

VIH-2_{CBL23} es una cepa viral de laboratorio establecida y el proceso de expansión del virus se realizó de forma similar al VIH-1_{NL4-3} (utilizando células MT-2 para la producción de nuevas partículas virales). El sobrenadante se alicuotó y se almacenó en

un tanque de nitrógeno líquido, para posteriormente ser titulado. El aislado VIH-2_{CBL23} se tituló mediante cuantificación de antígeno p24 por ELISA. Para asegurar la pureza del virus, las alícuotas descongeladas se filtraron a través de filtros de 0.22 µm antes de la cuantificación.

VISmac239 es un virus derivado de un clon molecular infeccioso y causa una infección típica de un lentivirus. Para evitar las mutaciones que aparecen durante el crecimiento prolongado del VIS, se utilizó un doble método para la producción del stock viral. Primero, el virus se generó en células 293T mediante transfección transitoria y posteriormente, el virus producido por un único ciclo de replicación en las 293T se utilizó para los ensayos de transmisión viral a través de la monocapa de HEC-1A. El protocolo de transfección constó de dos volúmenes independientes de 60 µL, el primero con mezcla de 2 µg de ADN, 6 µL CaCl₂ a 2.5M y agua, y el segundo con 50 mM HEPES (LONZA, Belgium). Se mezclaron ambos volúmenes haciendo burbujas con una pipeta y se dejaron incubando a 25 °C durante 20-30 min. Se añadió el volumen total a cada pocillo de 293T (2 x 10⁵ células en 2 mL de MCC3 en placa de 6 pocillos) y se cambió el medio a las 24 h. El sobrenadante se recogió a las 72 h, se filtró y se tituló en la línea celular P4-R5 MAGI. Se siguió el protocolo de cuantificación de unidades infectivas de virus en función de la actividad β-galactosidasa publicado por Tobiume et al. [190]

3.9.2 Reactivos utilizados

Los reactivos utilizados como controles de inhibición de la replicación viral fueron: **AZT** o zidovudina (**azidotimidina; Retrovir, GSK**), análogo de nucleósido inhibidor de la transcriptasa inversa; **T-20 (Fuzeón, Genentech USA, Inc. and Trimeris, Inc)** inhibidor de la fusión del VIH con las células; **dextrano (Dx, Sigma-Aldrich®)**, molécula inerte que se utilizó en determinados ensayos como control de no producir toxicidad celular (4,85 x 10⁵ g/mol); **dextrano sulfato (DxS, Sigma-Aldrich®)**, molécula inerte que se utilizó en determinados ensayos para evidenciar la inhibición de la transmisión viral en presencia de grupos sulfato (5 x 10⁵ g/mol); **suramin (Sur, Sigma-Aldrich®)**, se seleccionó como control positivo de la inhibición de la adhesión ya que se

ha demostrado su unión electrostática a la glicoproteína de la envuelta gp120 de la región V3 de VIH, lo que impide que su maquinaria de infección funcione correctamente [191]; **vinil sulfonato de sodio (VSS, Sigma-Aldrich®)**, monómero de los DEC- con grupos sulfonato en la periferia. Es la molécula que aporta las cargas negativas a la estructura global del dendrímero y que se utilizó como control negativo de efecto antiviral *per se*.

3.9.3. Infección *in vitro* de las diferentes poblaciones celulares

Las CMSP se estimularon durante 48 h con 2 µg/mL de PHA y 50 UI/mL de IL-2, para producir una activación policlonal; a las 48 h se lavaron las células con PBS. La concentración deseada de CMSP o MT-2 se incubó con el número de partículas de VIH determinado para cada experimento. La infección se realizó utilizando una concentración conocida de virus titulada previamente por ELISA de antígeno p24 o utilizando el ratio de infección (*MOI*). Las células se incubaron en MCC durante 3 h y en CC. Tras este tiempo se recogieron las células del cultivo y se lavaron tres veces con PBS para eliminar el virus no integrado en el genoma celular, tras lo cual se depositaron en placa de 24 pocillos o 96 pocillos en medio completo con 20 UI/mL de IL-2.

3.9.3.1. Pre- y post- tratamiento de células mononucleares de sangre periférica

Se utilizaron CMSP activadas dispensadas en 2×10^5 células en 200 µL de medio completo en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Para el experimento de pretratamiento, se trató con el dendrímero 1 h antes de la infección a 50 ng de VIH-1_{NL4-3} y se infectó durante 3 h en CC. Tras este tiempo, se lavó dos veces con PBS y se incubó en CC. En el experimento de post-tratamiento, el dendrímero se añadió tras las 3 h de infección para estudiar el efecto en la replicación del VIH-1_{NL4-3}. La concentración viral se cuantificó por ELISA de antígeno p24.

3.9.3.2. Inhibición de la entrada en células dendríticas y macrófagos

Una vez diferenciadas las células, se lavaron con PBS dos veces y se dispensaron 2×10^5 CD_i, 2×10^5 CD_m y 10^5 MΦ en 200 μL de medio completo en placas de 96 pocillos. El dendrímero se añadió 1 h antes de la infección. Después de añadir las partículas virales (50 ng), se incubó en CC y a las 3 h, se retiró el sobrenadante y se lavó 2 veces con PBS. Se recogió sobrenadante a los 4 días. La concentración viral se cuantificó antígeno p24 por ELISA.

3.9.4. Inhibición de la infección viral en células HEC-1A

Para estos ensayos se utilizaron células HEC-1A confluentes en placas de 24 pocillos. Se procedió al cultivo de 3×10^5 células en 500 μL de MCC2 por pocillo y se cultivaron durante 72 h. En los ensayos de infección, se pre-trataron las células con los dendrímeros 2 h, 1 h y 30 min antes de la infección con el VIH-1_{NL4-3}. Una vez cumplido el tiempo, se procedió a infectar con el VIH-1_{NL4-3} a 200 ng de VIH/10⁶ células durante 3 h. Tras este tiempo, se procedió a lavar 3 veces la monocapa con PBS y se dejó en CC. A las 24 h y 72 h, se recogió sobrenadante para cuantificar antígeno p24 por ELISA.

Para el ensayo de internalización, el procedimiento inicial fue el indicado anteriormente. Tras las 3 h de infección, se lavó 3 veces la monocapa con PBS y se procedió a la lisis celular mediante la adición de Tritón x-100 0,2 % durante 45 min a 37 °C. El sobrenadante se recogió para cuantificar antígeno p24 por ELISA.

3.9.5. Estudio de la inactivación de VIH y VIS por el DEC- 2G-S16

Para el ensayo con VIH, se utilizó una placa de 96 pocillos de fondo plano con PLL recubriendo el fondo del pocillo. Para ello, 50 μL de PLL se incubaron a 37 °C durante 1 h. Tras lavar los pocillos 3 veces con PBS, se incubaron 4 ng de VIH toda la noche a 4 °C, para asegurar que las partículas virales se adhirieron al fondo del pocillo. Se lavó

cada pocillo 3 veces con PBS para retirar el VIH no adherido a la placa y se procedió al tratamiento de cada pocillo con distintas concentraciones de dendrímero durante 1 h. Tras este tiempo, se lavó 3 veces con PBS y se añadieron CMSP previamente activadas (2×10^5 células en 200 μ L MCC1). El sobrenadante de este cultivo se recogió a los 4 días y se cuantificó antígeno p24 por ELISA para evaluar la cantidad de VIH producida por las CMSP en los distintos tratamientos. Se utilizó como control positivo de lisis de las partículas virales Tritón x-100 al 1 %.

En el ensayo con VIS se procedió de forma similar pero, tras la fijación de 35 unidades infectivas (UI) de VIS y el tratamiento con los dendrímeros 1 h, se añadieron M8166 (2×10^5 células en 200 μ L MCC1). El sobrenadante de este cultivo se recogió a los 4 días y se cuantificaron las partículas infectivas mediante el protocolo de cuantificación de unidades infectivas de virus en función de la actividad β -galactosidasa, utilizado para titular VISmac239 (apartado 3.9.1.). Se utilizó como control positivo de lisis de las partículas virales Tritón x-100 al 1 %.

3.10. ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE LA BARRERA EPITELIAL VAGINAL

3.10.1. Formación de la monocapa de HEC-1A

Se utilizó la técnica de espectrofluorimetría para evaluar la formación de la monocapa a lo largo del tiempo, así como la tinción de las uniones intercelulares estrechas o *tight junctions* con AgNO_3 y la observación de la monocapa en microscopía DIC.

Se diseñó un experimento con dextrano fluoresceinado (Dx-FITC, Sigma-Aldrich®) de 3 kDa y un cultivo de 2×10^5 HEC-1A por dispositivo *transwell* (soporte de policarbonato permeable de 0.4 μ m de poro. Costar, Cambridge, MA). Se depositaron 50 μ g de Dx-FITC en la parte apical a día 4, 7, 9 y 11 del cultivo de células. Mediante un espectrofluorímetro FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH), se cuantificó la cantidad de Dx-FITC en la cámara inferior a distintos tiempos (30, 90 y 300 min) y se relacionaron los valores obtenidos con una curva patrón de Dx-FITC a través del *transwell* sin células. De

forma paralela, se realizaron dos ensayos: A) Cultivo de 2×10^5 HEC-1A en soportes para microscopía confocal y observación de la confluencia celular por DIC. B) Cultivo de 2×10^5 HEC-1A en pocillos de placa p24 (diámetro similar al interior del *transwell*) para evaluar la formación de *tight junctions*. Para ello se preparó una solución de 0.4 % de AgNO_3 en glucosado 5 % y se procedió utilizando 300 μL de ésta solución por pocillo. Tras 1 min, se lavó con medio glucosado y se pusieron unas gotas de glicerol. Se dejó 10 min bajo luz UV y se lavó con formaldehído al 10 %. Después de 20 min, el formaldehído se retiró y se observó el pocillo al microscopio.

Las soluciones tampón utilizadas como control fueron PBS y HBSS (del inglés *Hank's Buffered Salt Solution*) y se utilizó EGTA (*Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*) a 1mM como control de inhibición de la formación de las *tight junctions* (agente quelante que secuestra el Ca^{2+} extracelular).

La resistencia eléctrica transepitelial (*TEER*) a través de la monocapa de células HEC-1A y VK2/E6E7 se monitorizó mediante el uso de un voltímetro EVOM² y un electrodo STX2 (World Precisión Instruments, Sarasota, USA). Los valores de *TEER* fueron corregidos sustrayendo el valor del fondo o *background* del dispositivo de *transwell*, obtenido en ausencia de células y con el mismo volumen de medio. El resultado final de *TEER* se corrigió en función del área del inserto y se expresó en $\Omega \times \text{cm}^2$.

3.10.2. Inhibición de la transmisión viral

Para obtener una monocapa perfecta de células epiteliales polarizadas, las HEC-1A y las VK2/E6E7 se cultivaron durante 7 días, con cambios de medio cada 48-72 h. El dendrímero se añadió 1 h antes de la infección. Después de añadir las partículas virales a la cámara superior de la monocapa (100 ng), se recogió el sobrenadante de la cámara inferior a las 24 o 48 h. La concentración viral de antígeno p24 en la cámara inferior se cuantificó por ELISA.

3.11. BIODISTRIBUCIÓN DEL DENDRIPLEX EN RATONES

Se conocía por estudios previos del grupo que ratones de la cepa CD1 tenían una tolerancia de 15 mg de DEC+ NN16 por Kg de ratón. Tomando como referencia estos datos, se calculó la concentración máxima de dendrímero que se utiliza.

Como el peso medio de los ratones adultos es de 20 g y los mg de dendrímero que toleran son 15 mg/kg, 0,3 mg es la concentración máxima de DEC+ NN16 en el experimento (15 mg/kg x 0,020 kg). Los ratones tienen entre 76-80 mL de sangre por kg de ratón. Para 20 g de ratón, el volumen es de 1,5 mL, lo que da una concentración de 200 µg/mL (0,3 mg/1,5 mL). 200 µg/mL corresponden a 43,5 µM (Pm del DEC+ NN16: 4600 g/mol). Esta fue la dosis más alta que se usó en el experimento. Para el cálculo de la concentración de ODN TAR-FITC necesaria para un ratio 2/1, se calculó el ratio de cargas: 16 cargas negativas de TAR x 2: 32 cargas positivas. Como en este caso, coincidían las cargas positivas y negativas por molécula, el factor divisor fue 2: $43,5 / 2 = 21,75$ µM de ODN TAR-FITC.

Para el experimento preliminar se utilizaron ratonas BALB/c (H-2d) de 8 semanas de edad. Los ratones fueron adquiridos a Harlan España y se mantuvieron en el animalario del Hospital General Universitario Gregorio Marañón en ambiente estéril y con condiciones de luz y temperatura controlada. Los procedimientos que se utilizaron con los ratones y su cuidado se llevaron a cabo de conformidad con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del *NIH* y de acuerdo con la normativa vigente (Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos). El Comité de Ética en Experimentación Animal del Hospital General Universitario Gregorio Marañón aprobó todos los procedimientos descritos. Se utilizaron 3 ratones BALB/c (H-2d) hembras de un peso medio de ensayo de 20 g.

Para la calibración del dispositivo de imagen y obtención del límite de detección de la técnica, se realizaron 6 diluciones 1/3 de la concentración stock de 43,5 µM (Fig. 22).

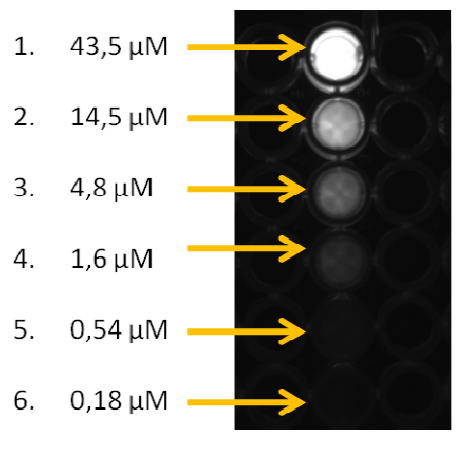


Fig. 22 Diluciones 1/3 del dendriplex DEC+ NN16/TAR-FITC. La figura muestra el límite de detección de la técnica (hasta 5 µM). En el experimento con ratones se utilizaron las concentraciones de 43,5 y 14,5 µM.

Durante la calibración del aparato, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para confirmar la formación del complejo. En las 6 diluciones, el ODN TAR-FITC quedó retenido en el pocillo.

Todos los ratones se anestesiaron con una mezcla de Xilacina (20 mg/mL, CALIER) y Ketamina (50 mg/mL, Pzifer) por vía intraperitoneal. Se preparó un stock de 150 µL de Xilacina, 800 µL de Ketamina y 9000 µL de PBS. Se inyectaron 21 µL de la mezcla por cada gramo de ratón. El dendriplex se administró por vía intravenosa, inyectando un volumen total de 250 µL PBS en la vena lateral de la cola. Se utilizó un ratón control (V): Solo se inyectó el vehículo (250 µL PBS); un ratón a dosis alta (DA): Dendriplex NN16/TAR a una concentración de NN16 de 43,5 µM (ratio 2/1); un ratón a dosis baja (DB): Dendriplex NN16/TAR a una concentración de NN16 de 14,5 µM (ratio 2/1). 30 min después de la inyección, los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical. Los órganos se extrajeron y se colocaron en solución de PBS en diferentes placas petri. El cuerpo del ratón y los órganos se analizaron en un FMT (*Fluorescence Molecular Tomography* [192]).

3.12. ESTUDIO GENÉTICO POR *MICROARRAYS* DE LOS DENDRÍMEROS CARBOSILANO ANIÓNICOS

Para el estudio de los genes desregulados en presencia de los DEC- 2G-S16 y 2G-C16, se diseñó un experimento por duplicado sobre monocapas de HEC-1A en dispositivos de transwell (apartado 3.10.1.). Sobre la parte apical se dispensaron los DEC- a una concentración de 5 μ M y durante 1 h. Como control se recogieron células sometidas a las mismas condiciones, excepto que no fueron expuestas al DEC-. Transcurrido el tiempo se recogieron las células utilizando tripsina 0.25 %/EDTA 0.02 % (Biochrom AG, Alemania) y el pellet seco se procesó para extracción de ARN utilizando el kit *High Pure RNA Purification kit* (Roche). El ARN obtenido fue cuantificado mediante el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc.) y su integridad analizada mediante electroforesis en chip utilizando el Bioanalizador 2100 (Agilent). De cada muestra se amplificaron 800 ng de ARN total utilizando el kit *Amino Allyl MessageAmpTM II aRNA amplification kit* (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se marcaron 7 μ g de cada ARN amplificado con Cy5 y Cy3 por separado y posteriormente se purificaron siguiendo las instrucciones del fabricante. El marcaje fue cuantificado con el Nanodrop. Se tomaron 150 pmol de Cy3 o de Cy5 de cada sonda para las hibridaciones. Se realizó la comparación de las células tratadas con los dendrímeros 2G-S16 o 2G-C16 frente a las mismas células sin dendrímero. Se hicieron dos réplicas biológicas de cada muestra y todas las hibridaciones se hicieron por duplicado cambiando el fluorocromo (Dye-swap). Es decir, la muestra control marcada con Cy5 fue hibridada en un *array* con la muestra 2G-S16 marcada con Cy3 y en otro con la muestra 2G-C16 marcada con Cy3, mientras que la muestra control marcada con Cy3 fue hibridada en un *array* con la muestra 2G-S16 marcada con Cy5 y en otro con la muestra 2G-C16 marcada con Cy5. La hibridación fue realizada durante 17 h en horno de hibridación giratorio (10 r.p.m.) utilizando *microarrays Whole Human Genome Microarray kit*, *Gene Expression Hybridization kit* y *Gene Expression Wash Buffer kit* siguiendo las instrucciones del fabricante Agilent. Los *arrays* fueron escaneados utilizando un escáner Axon4000B (Molecular Devices) y los datos extraídos mediante el software GenePix v4.0 (Molecular Devices). El fondo o *background* fue extraído por Normexp, los *arrays* individuales normalizados por loess y posteriormente por cuantiles. Se calculó un *p*-valor mediante la aplicación LiMMa utilizando el paquete bioconductor

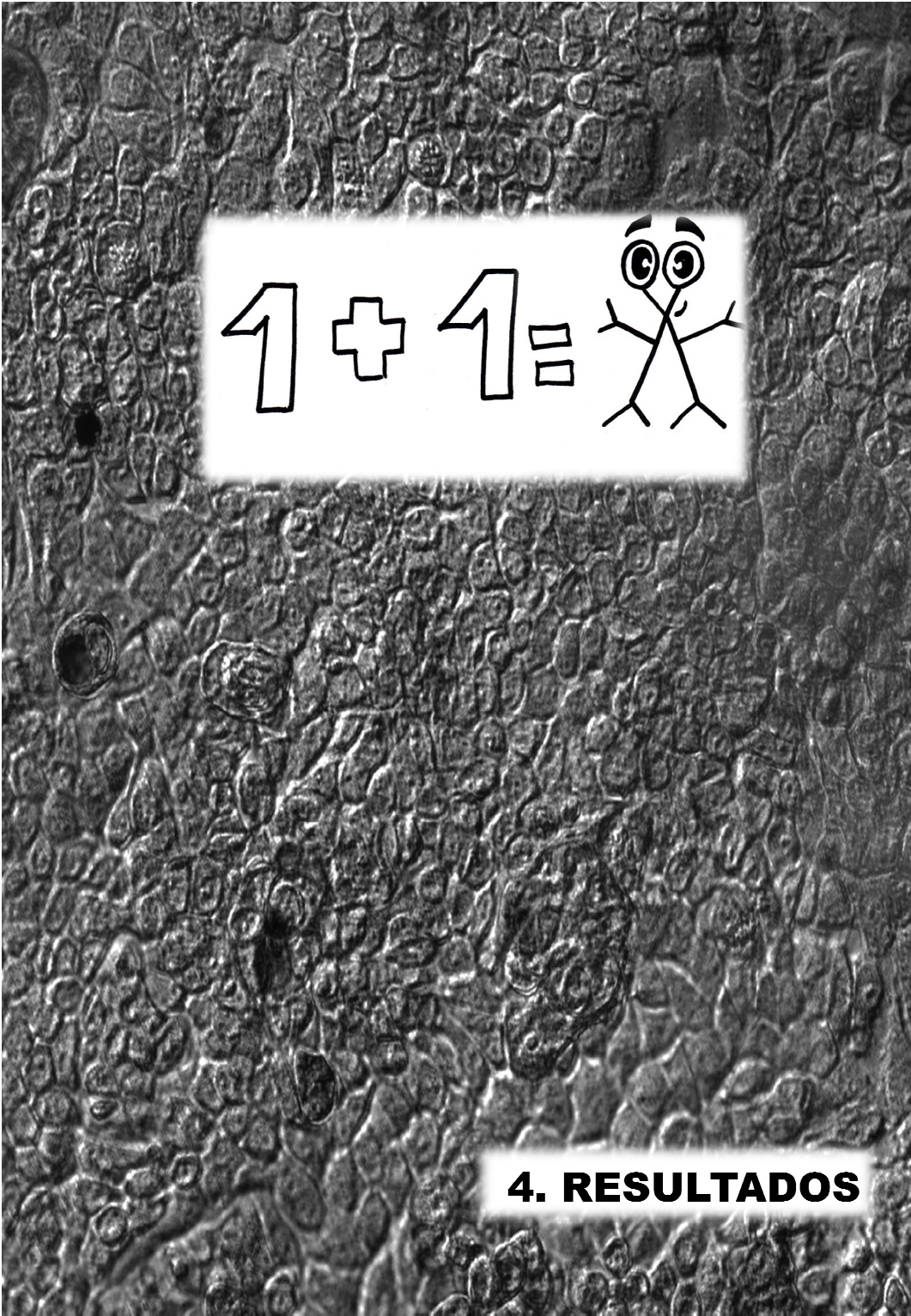
en el entorno R. Un *p*-valor menor a 0,05 fue considerado como estadísticamente significativo. Para la filtración y visualización de los resultados se utilizó la aplicación Fiesta (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA>). Para seleccionar los genes cuya expresión cambiaba como consecuencia de la exposición a alguno de los dendrímeros se utilizaron los siguientes filtros: *p*-valor <0,05, logaritmo de la intensidad de señal >8 y ratio >2 ó <-2. Se utilizó la base de datos *Ingenuity Pathways Analysis (IPA)* (<http://www.ingenuity.com>) para estudiar las funciones asociadas a los genes seleccionados.

3.13. ENSAYO IN VIVO DEL DEC- 2G-S16 EN CONEJOS HEMBRA BLANCOS DE NUEVA ZELANDA

Este estudio se realizó cumpliendo los requisitos de la norma ISO 10993: Evaluación biológica de dispositivos médicos, Parte 2 (2006): Requisitos para el bienestar animal, parte 10 (2002) y parte 10/A1 (2006): Ensayo de irritación e hipersensibilidad. Se llevó a cabo por la compañía Biomatech (Chasse-sur-Rhone, Francia) la cual está certificada por la norma europea ISO 17025.

Doce conejos hembra de la raza blanco de Nueva Zelanda, nulíparas y no preñadas fueron utilizadas para determinar el potencial efecto irritable de dos formulaciones de DEC- 2G-S16 tras su aplicación vaginal. El primer día antes de la administración, los conejos fueron pesados y designados en cuatro grupos: tres conejos tratados con una dosis baja de 2G-S16 (2G-S16-DB; diluido 100 veces en PBS: 1 µM <> 3.7 µg/mL <> 0.04 %), tres con una dosis alta (2G-S16-DA; diluido 10 veces en PBS: 10 µM <> 37 µg/mL <> 0.4 %), tres tratados con PBS (Vehículo) y tres tratados con una solución de NaCl 0.9 % (control negativo). Los animales recibieron vaginalmente 1 mL de 2G-S16, PBS o NaCl. La administración se realizó con la inserción de una cánula de PVC unida a una jeringa, introducida en la cavidad vaginal. El tratamiento se llevó a cabo diariamente durante cinco días consecutivos la primera semana. No fue aplicado ningún tratamiento durante dos días. El procedimiento inicial se repitió de nuevo durante otros cuatro días. Antes y 24 h después de la aplicación se examinó la apariencia de la abertura vaginal y el perineo para posibles signos de secreción vaginal, edema o

eritema. 24 h después de la última aplicación, los conejos se sacrificaron con una dosis letal de barbitúrico (Dolethal®, 2 mL/Kg). La vagina fue diseccionada, abierta longitudinalmente y examinada para signos de irritación, lesiones en la mucosa o necrosis. Las muestras de tejido se sumergieron en un tampón neutro de formalina al 10 % antes del examen histológico. Se realizaron tres cortes transversales de los bloques de parafina para evaluar la región cervical, central y caudal de cada vagina. Las muestras se deshidrataron en soluciones de alcohol de distintas concentraciones, eliminado con xileno y sumergido en parafina. Las muestras se cortaron entre 5 y 7 µm usando un micrótopo (Microm®, Francia) y teñidas con una coloración de hematoxilina y eosina siguiendo el protocolo estándar de trabajo I-HIS-055. Las secciones fueron examinadas por un patólogo.


$$1 + 1 = \text{stick figure with large eyes}$$

4. RESULTADOS

Los resultados se han dividido en dos secciones. En la primera sección se estudian los DEC+ formando complejos con ODN anti-VIH con el objetivo de su utilización en terapia génica y en la segunda sección se estudian los DEC- para su utilización como nanomoléculas anti-VIH *per se*. La síntesis y propiedades fisicoquímicas de los dendrímeros de estructura carbosilano utilizados en el desarrollo de esta Memoria están previamente publicadas [181-183]. La caracterización de los complejos o dendriplexes DEC+/ODN se detalla a continuación en estudios electroforéticos y espectrofluorimétricos, para posteriormente evaluar su potencial en terapia génica frente al VIH.

I. DENDRÍMEROS DE ESTRUCTURA CARBOSILANO CATIÓNICOS

4.1. FORMACIÓN DEL DENDRIPLEX DEC+/ÁCIDOS NUCLEICOS

La electroforesis en gel de agarosa se utilizó para estudiar el dendriplex formado tras la interacción electrostática entre los DEC+ (N8, N16, NN8 y NN16) y ácidos nucleicos de cadena corta (ODN fluoresceinados: PPT, TAR, GEM91 y SREV). Se observó que el ODN migraba hacia el ánodo debido a su carga neta negativa. Sin embargo, cuando se formó el dendriplex con un exceso de DEC+, se observó una ausencia de migración del ODN. La integridad de los DEC+ en el complejo formado se evaluó en diferentes condiciones debido a la capacidad de hidrólisis del enlace Si-O. Se realizaron ensayos para determinar si la retención del ODN en los geles de agarosa y por tanto la formación de complejos entre los DEC+ y el ODN, se debían a la estructura dendrímica totalmente conservada o por el contrario, eran los grupos funcionales terminales desprendidos del esqueleto dendrímérico los responsables de la retención del ODN. Se estableció una concentración de 1 μ M para los ODN fluoresceinados y un ratio de 2/1 de DEC+/ODN (dendriplex) para la realización de la mayoría de los experimentos. Se compararon las mezclas de dendrímeros-ODN, monómeros-ODN y ODN (Figs. 23 y 24).

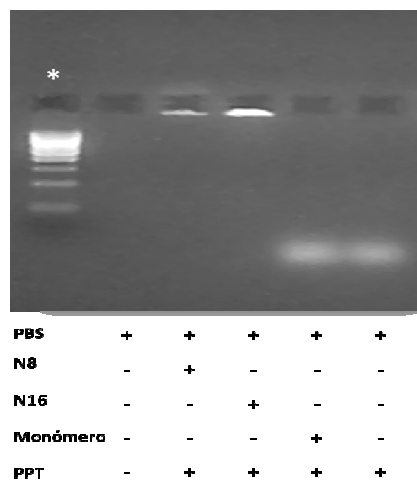


Fig. 23 Los DEC+ forman complejo con los ODN (dendriplexes DEC+/ODN). Retención de la migración del ODN PPT por el dendrímero N8 y N16 a ratio 2/1. El monómero representa el grupo funcional sin la estructura carbosilano ($HOCH_2CH_2NMe_3^+I^-$) y también se utilizó a ratio 2/1. Se obtuvo el mismo resultado para los DEC+ NN8 y NN16. *Marcador en escalera de ADN de 100 pb.

Se observó que el ODN en el dendriplex no migraba hacia el ánodo, indicio indirecto de que se había producido la formación del complejo entre el DEC+ y el ODN (Fig. 23).

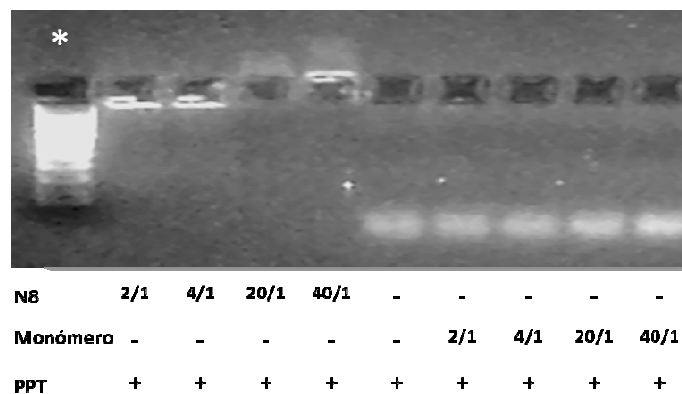


Fig. 24 Los DEC+ pueden invertir la migración del ODN. El dendrímero N8 formó complejo con el PPT a distintos ratios de carga. El monómero representa el grupo funcional sin la estructura carbosilano ($HOCH_2CH_2NMe_3^+I^-$). Se obtuvo el mismo resultado para los DEC+ N16, NN8 y NN16. *Marcador en escalera de ADN de 100 pb.

El resultado de estos ensayos mostró que para retener la migración del ODN era necesaria la estructura carbosilano, siendo incapaz el monómero de retener la migración del ODN a pesar de su carga positiva (Fig. 23 y 24).

Los DEC+ fueron capaces de retener la migración de otros ácidos nucleicos utilizados en terapia génica como siRNA y plásmidos, independientemente de su tamaño y composición. Dependiendo del ratio +/- utilizado, la migración de los ácidos nucleicos se invirtió hacia el cátodo al aumentar el número de moléculas de DEC+ en el dendriplex (Figs. 25 y 26).

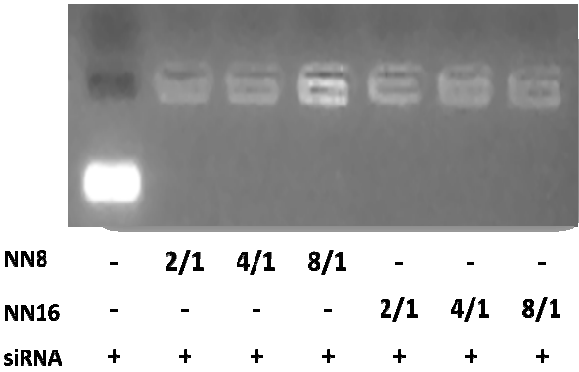


Fig. 25 Los DEC+ forman complejo con los siRNA (dendriplex). Retención de la migración del siRNA p24 (2 µg) por el dendrímero NN8 y NN16 a diferentes ratios. Se obtuvo el mismo resultado para los DEC+ N8 y N16.

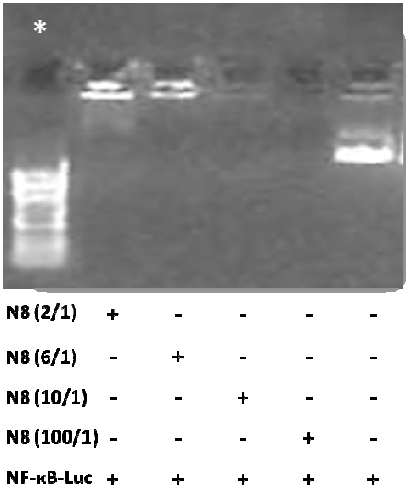


Fig. 26 Los DEC+ forman complejo con plásmidos (dendriplex). Retención de la migración del plásmido NF-κB-Luc (1 µg) por el dendrímero N8 a diferentes ratios. Se obtuvo el mismo resultado para los DEC+ N16, NN8 y NN16.
*Marcador en escalera de ADN de 5000 pb.

4.2. ESTABILIDAD DE LOS DEC+ EN SOLUCIÓN ACUOSA

Con el objetivo de evaluar la vida media de estos dendriplexes para su uso en experimentos de transfección, se llevaron a cabo diversos estudios electroforéticos para conocer la estabilidad en agua de los dendriplexes formados tras 24 h. Se determinó la liberación a lo largo del tiempo del ODN por parte de los distintos DEC+ a pH fisiológico (7,35-7,45) para poder utilizarlos en la liberación controlada de ácidos nucleicos o fármacos (Fig. 27).

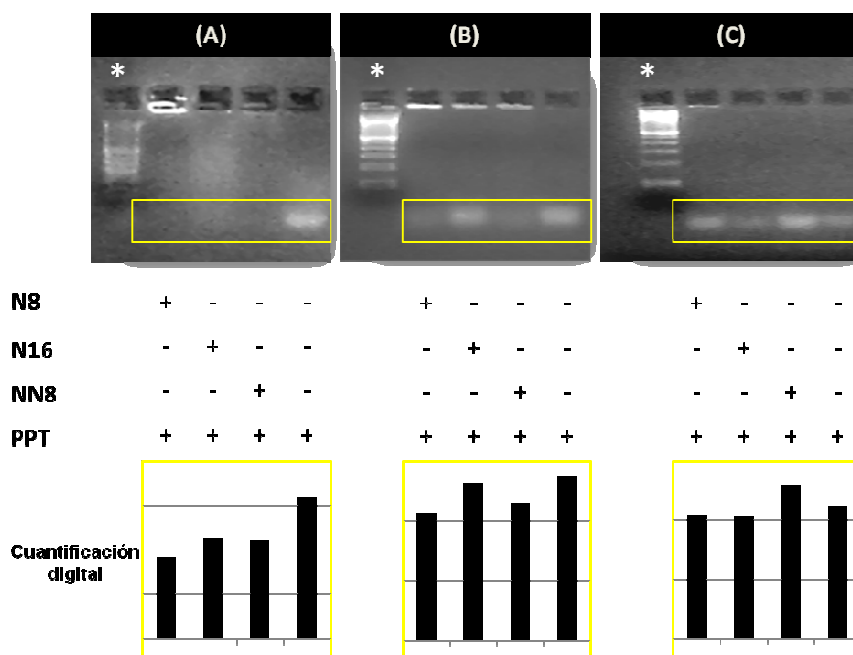


Fig. 27 Estabilidad del dendriplex en disolución acuosa. Estudio de los dendriplexes tras: (A) 20 min, (B) 6 h y (C) 24 h, después de la formación del complejo a ratio 2/1. Se utilizaron CC en la realización del experimento. Se obtuvo el mismo resultado para el DEC+NN16. *Marcador en escalera de ADN de 100 pb.

Se determinó mediante cuantificación digital, la intensidad a lo largo del tiempo del ODN cuando éste migró al polo positivo del gel. Los dendriplexes mostraron una liberación gradual del ODN durante las primeras 24 h.

Este resultado se confirmó mediante el seguimiento de la descomposición de los DEC+ en D₂O por espectroscopia de RMN-¹H. En la figura 28 se muestra la degradación del DEC+ N8 durante las primeras 12 h.

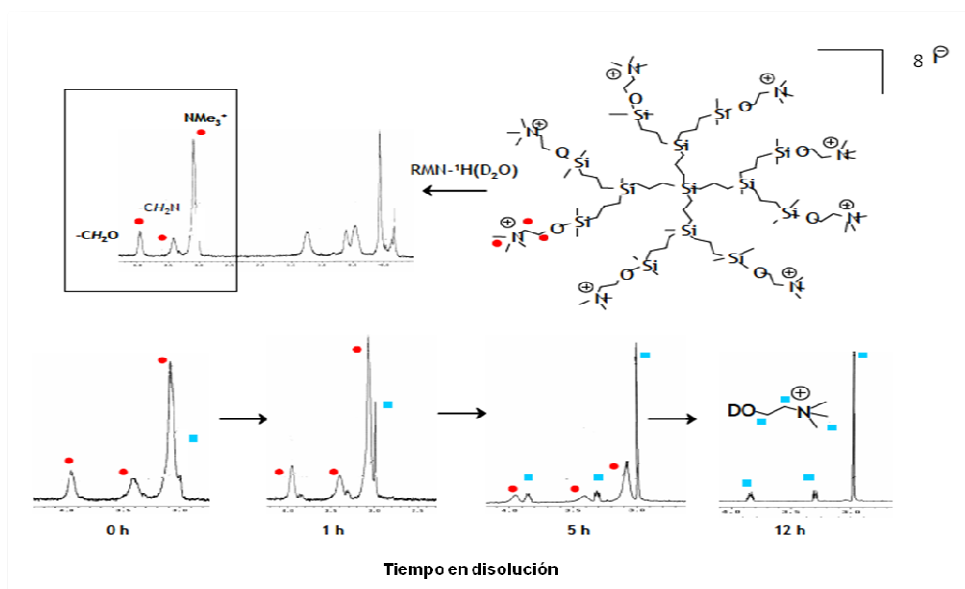


Fig. 28 Seguimiento por espectroscopia de RMN-¹H de la degradación del DEC+ N8 en D₂O. Los recuadros azules muestran la aparición de señales correspondientes al producto de hidrólisis DOCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻.

Inicialmente se observó que las señales correspondientes al DEC+ N8 eran poco definidas (tiempo 0). Para el fragmento externo -OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻ se observaron dos multipletes a 3.94 y 3.40 ppm asignados a los grupos -CH₂O- y -CH₂N- respectivamente. Los grupos metilo unidos directamente a nitrógeno se localizaron como un singlete ancho a 3.06 ppm. A lo largo del tiempo se observó la aparición de señales correspondientes al producto de hidrólisis [DOCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻] en el espectro de RMN-¹H (tiempo de 1 h). Para este derivado se observaron dos multipletes más estructurados a 3.85 y 3.30 ppm y un singlete estrecho a 2.98 ppm a las 5 h que corresponden a los protones de los grupos -CH₂O-, -CH₂N- y -NMe₃⁺ respectivamente. A las 12 h de la disolución del DEC+ N8 en D₂O se detectaron únicamente las señales correspondientes al producto de hidrólisis DOCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻ indicando una menor retención del ODN por

parte de los DEC+ que estuvieran más tiempo en disolución acuosa. Los espectros de RMN-¹H para los DEC+ N8, N16 y NN16 mostraron resultado idéntico.

4.3. ESTABILIDAD DE LOS DEC+ EN FUNCION DEL pH

Se realizaron estudios de estabilidad del dendriplex a diferentes pHs para observar cómo afectaban los cambios de pH al complejo, dado que existen distintas localizaciones anatómicas, tisulares o celulares en las cuales el pH se acidifica o alcaliniza. Ejemplos son el ambiente ácido del estómago, el básico de las secreciones pancreáticas al intestino delgado o el compartimento endosoma-lisosoma a nivel celular, donde se cambia de un pH fisiológico (7,35-7,45) a un pH ácido (4-4.5). Se determinó el rango de pH donde el dendriplex mantenía su conformación inicial. Se formó el dendriplex DEC+ NN8/ODN PPT y se añadieron volúmenes en exceso de soluciones con pH desde 2.8 hasta pH 8 (Fig. 29).

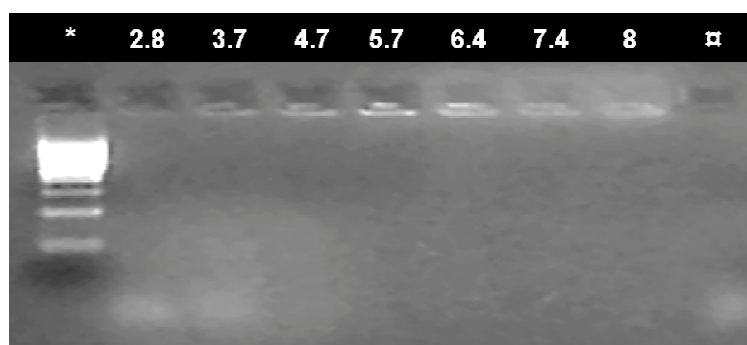


Fig. 29 Estabilidad del dendriplex a distintos pHs. Estudio del dendriplex NN8/PPT a ratio 2/1 en soluciones acuosas a distinto pH. El dendriplex se mantuvo 20 min en cada solución bajo condiciones de cultivo. ▣ Representa la migración de PPT a pH 7.4. Se obtuvo el mismo resultado para el DEC+ NN16. *Marcador en escalera de ADN de 100 pb.

El dendriplex DEC+ NN8/ODN PPT se mostró alterado a pH < 5.7. En la figura 29 se observa una liberación parcial del ODN PPT a pH ácido a los 20 min.

4.4. PROTECCIÓN DE LOS DEC+ A LOS ÁCIDOS NUCLEICOS FRENTE A LA DEGRADACIÓN POR LAS NUCLEASAS

Los ODN utilizados en esta Memoria son de naturaleza fosforotioato y por esta razón una solución con ADNasa I no afectó a la integridad del ODN, tras incubarse 30 min y 1 h a 37 °C con ADNasa I antes de realizar la electroforesis en gel de agarosa (Fig. 30).

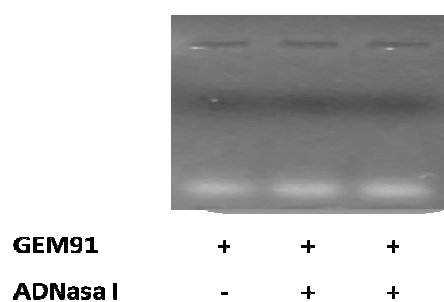


Fig. 30 Integridad de los ODN de naturaleza fosforotioato. La ADNasa I no degradó el ODN GEM91 tras 30 min y 1 h de incubación a 37 °C debido a la naturaleza fosforotioato del GEM91.

Con el objetivo de analizar si los DEC+ protegen de la degradación de la ARNasa, se utilizó un dendriplex formado por DEC+/siRNA y se enfrentó a ARNasas (Fig. 31)

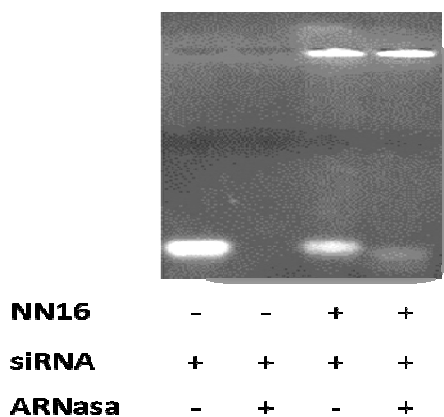


Fig. 31 Los DEC+ protegen a los siRNA frente a la degradación por ARNasa A. El siRNA antiGAG de 21 pb y el dendriplex se incubaron en presencia de ARNasa A durante 30 min. El siRNA en presencia de ARNasa A fue degradado completamente y debido al ratio de cargas del dendriplex que fue 1/1 se llevó a cabo la migración al ánodo del siRNA no unido al NN16.

En la figura 31 se observa la degradación del siRNA en presencia de ARNasa A. Se utilizó un ratio de carga 1/1 del dendriplex que permitió la migración de parte del siRNA no unido al DEC+ NN16. Este experimento mostró la protección del siRNA por DEC+ NN16 y la degradación del siRNA por ARNasa A.

4.5. INTERACCIÓN DE DENDRÍMERO Y DENDRIPLEX CON PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

4.5.1. Estabilidad del dendriplex en presencia de albúmina

La unión a proteínas plasmáticas es uno de los obstáculos con los que se enfrentan las terapias con ODN [164]. Dicha unión disminuye la biodisponibilidad del ODN haciendo necesaria una mayor dosis para poder ejercer el efecto biológico deseado. En este apartado se evaluó la influencia de la presencia de proteínas en el medio sobre la estabilidad del dendriplex y la protección al ODN para impedir la unión a proteínas del plasma.

En primer lugar, se realizó un estudio de los dendriplexes con los dendrímeros catiónicos N8, N16, NN8 y NN16 a diferentes ratios, para estudiar si existía alguna diferencia en la retención de la migración del ODN GEM91 (Fig. 32).

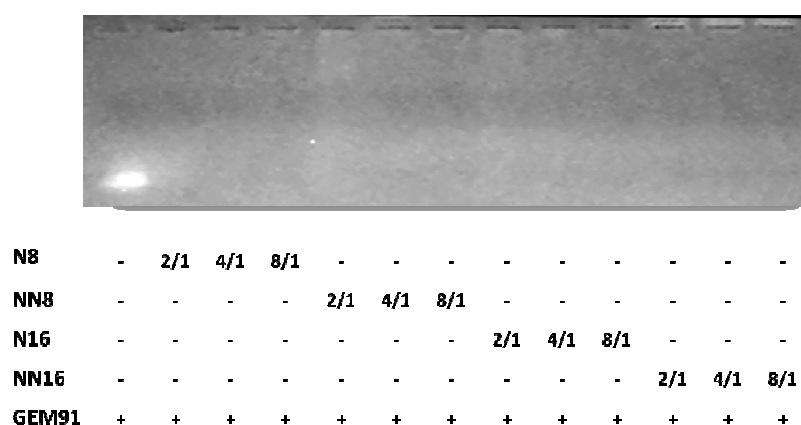


Fig. 32 Retención de la migración del ODN GEM91 por los DEC+ N8, NN8, N16 y NN16 a distintos ratios de carga. Estudio de los cuatro dendrímeros a ratios 2, 4 y 8 de cargas positivas frente a las cargas negativas del ODN GEM91.

En todos los casos el ODN fue retenido a los tres ratios evaluados, sin observarse liberación del ODN a tiempo cero (Fig. 32).

El siguiente paso fue evaluar la interacción entre dendriplexes (DEC+/TAR) y albúmina (Fig. 33).

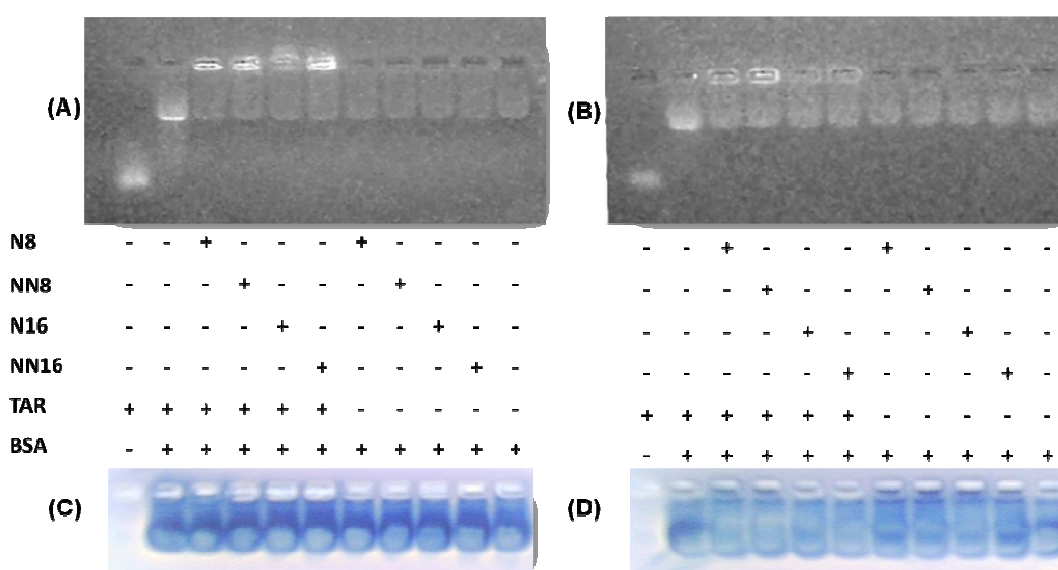


Fig. 33 Los DEC+ protegen al ODN TAR de la unión a BSA. (A) Estudio de los complejos formados entre los DEC+ N8, NN8, N16, NN16 y el ODN TAR a ratio 2/1. Se añadió BSA al 10 % a tiempo cero y 20 min después se cargó el gel. **(B)** Las mismas soluciones utilizadas en la figura (A) se mantuvieron 24 h en CC antes de llevar a cabo la electroforesis. **(C)** y **(D)** corresponden a los geles (A) y (B) tras la tinción con azul Paragón.

En las figuras 33A y 33B se muestra la interacción del ODN con BSA. No se observó disociación de ninguno de los dendriplexes en presencia de BSA tras 20 min de interacción (Fig. 33A) ni después de 24 h (Fig. 33B). Ninguno de los 4 dendrímeros retrasó la migración de la albúmina al ánodo. Para confirmar la presencia de albúmina, se tiñeron los geles con azul Paragón y se observó que la migración de la proteína fue similar en todos los casos (Fig. 33C-D).

Por último, se realizó un gel con los ODN TAR, GEM91 Y SREV formando dendriplexes con los dendrímeros NN8 y NN16 para asegurar que la longitud del ODN no

influyó en el comportamiento de los dendriplexes, siempre y cuando se mantuviera el mismo ratio de cargas (Fig. 34).

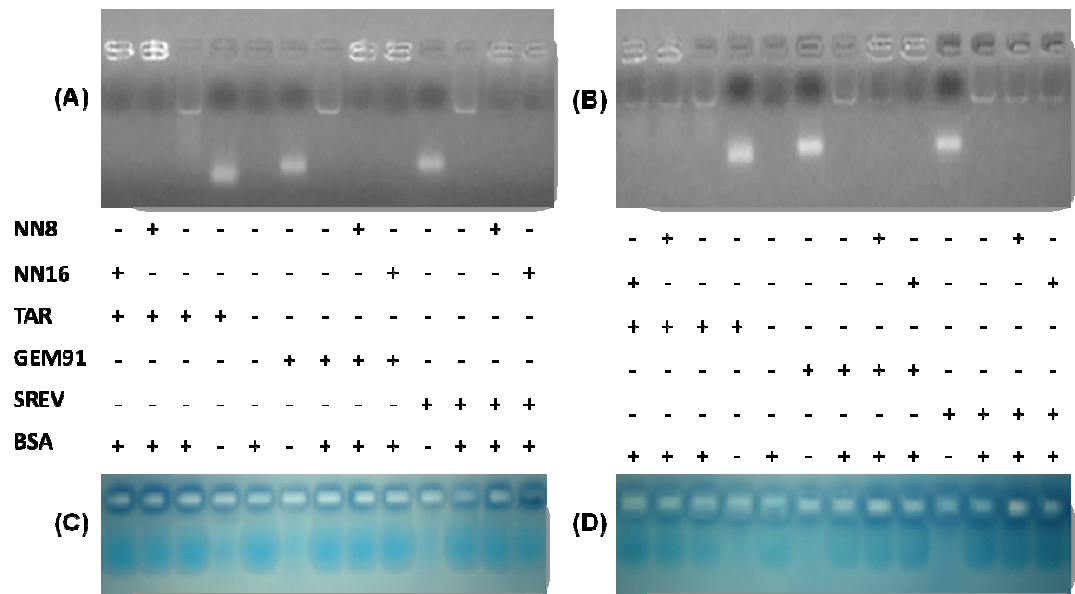


Fig. 34 Los DEC+ protegen a ODN de distinto tamaño de la unión a BSA. **(A)** Estudio de los complejos formados entre los DEC+ y los ODN TAR, GEM91 y SREV de 16, 25 y 28 pb respectivamente. Los dendriplexes se formaron a ratio 2/1 y se añadió BSA al 10 % a tiempo cero. 20 min después se cargó el gel. **(B)** Las mismas soluciones utilizadas en la figura (A) se mantuvieron 24 h en CC antes de llevar a cabo la electroforesis. **(C)** y **(D)** corresponden a los geles (A) y (B) tras la tinción con azul Paragón, respectivamente.

En la figura 34A se muestra que los dendriplexes a ratio 2/1 se comportaron de manera similar independientemente del DEC+ y del ODN utilizado. En la figura 34B se muestra que antes de 24 h se producía la degradación del dendrímero que permitía la migración del ODN, uniéndose este último a la albúmina e impidiendo la migración del ODN al ánodo.

4.5.2. Estabilidad del dendriplex en medio de cultivo completo

La liberación de los ODN por los DEC+ se produce de forma gradual durante las primeras 24 h (apartado 4.2.). Los experimentos de transfección para internalizar el ODN formando complejo con el DEC+ se llevaron a cabo en CC, en presencia de suero (apartado 3.4.2.1.), por lo que se realizó un ensayo del comportamiento del dendriplex en las mismas condiciones y a distintos tiempos (Fig. 35).

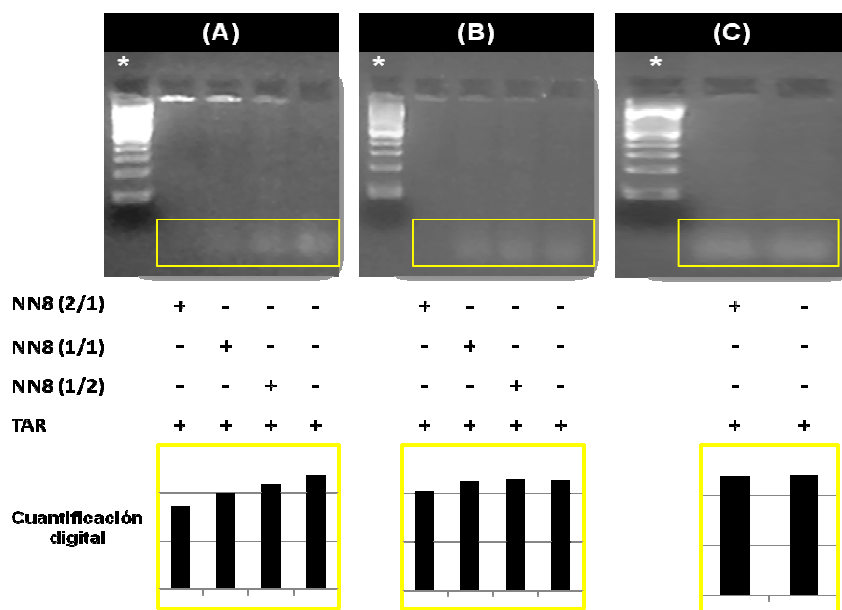


Fig. 35 Estabilidad del dendriplex en medio de cultivo completo y condiciones de cultivo. (A) Estudio del dendriplex DEC+NN8/ODN TAR a distintos ratios de carga a los 40 min de formarse el complejo. (B) y (C) corresponden a las mismas soluciones utilizadas en la figura (A) mantenidas 4 h y 17 h en CC antes de llevar a cabo la electroforesis. *Marcador en escalera de ADN de 100 pb.

Se observó una clara migración en todos los carriles de ODN TAR al ánodo, sin evidenciarse una interacción clara con las proteínas del STF (Fig. 35A). El ODN TAR liberado del dendriplex a las 17 h migró al mismo nivel que el ODN TAR libre, indicando que la concentración de BSA en el medio de cultivo era inferior a lo estudiado en geles anteriores donde se conocía exactamente el porcentaje de BSA en disolución. En el gel correspondiente a 40 min, se observó que solamente la relación 2/1 fue capaz de retener por completo al ODN TAR. Tras 4 h (Fig. 35B) no se observó la migración del ODN TAR, siendo liberado casi en su totalidad por el DEC+ NN8 a las 17 h (Fig. 35C). Los resultados muestran claramente que se necesita un exceso de carga para formar complejo con todas las moléculas del ODN TAR.

4.5.3. Estabilidad del dendriplex en presencia de un detergente aniónico

Para un estudio más detallado sobre la interacción electrostática entre los DEC+ y los ODN, se realizó un ensayo de electroforesis con el dendriplex DEC+ NN8/ODN TAR a ratio 2/1 en las condiciones que se exponen en la figura 36.

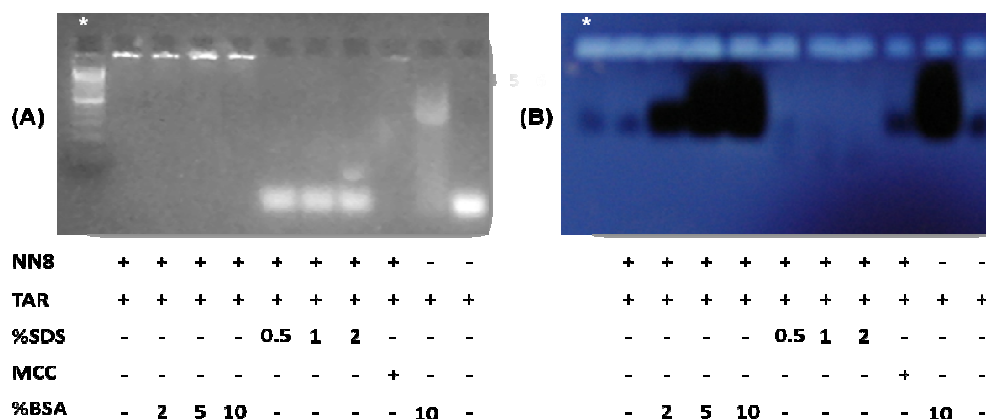


Fig. 36 Rotura del dendriplex en presencia de un detergente aniónico. (A) Estudio del dendriplex DEC+ NN8/ODN TAR a ratio 2/1 en presencia de distintas concentraciones de SDS y BSA. (B) El mismo gel tras la tinción con azul Paragón. Las bandas azules a mitad del gel son debidas a complejos de azul Paragón con el azul de bromofenol del tampón de carga. MCC: Medio de cultivo completo. *Marcador en escalera de ADN de 100 pb.

La figura 36A muestra la pérdida de interacción DEC+/ODN cuando un detergente aniónico (SDS) está presente en la disolución, permitiendo al ODN TAR migrar hacia el ánodo. La figura 36B muestra la presencia de proteína cuya intensidad de la señal está relacionada con la concentración utilizada en cada punto del ensayo. El dendriplex se comportó igual frente a un 10 % de BSA que frente a un 10 % de STF en MCC. Esto confirmó que la unión entre el DEC+ y el ODN se debía en gran medida a las interacciones electrostáticas.

4.5.4. Estabilidad del dendriplex en presencia de suero humano AB

Se evaluó la posible interacción del ODN TAR con las proteínas del suero humano AB. Se expuso el ODN TAR a distintas concentraciones de suero AB (Fig. 37).

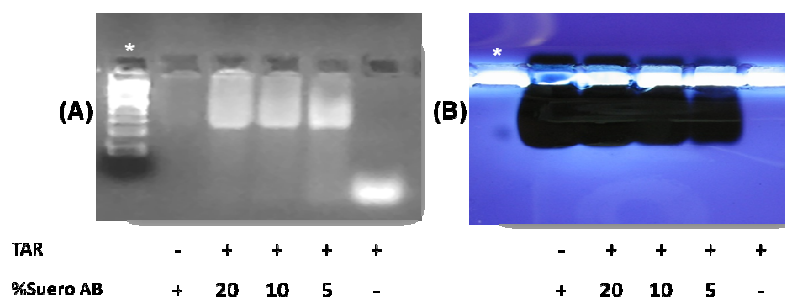


Fig. 37 Interacción del ODN TAR con las proteínas del suero humano AB (Suero AB). (A) Estudio de la interacción del ODN TAR con distintas concentraciones de suero AB. (B) El mismo gel tras la tinción con azul Paragón. *Marcador en escalera de ADN de 100 pb.

Se observó una señal degradada más intensa a medida que disminuía la concentración de suero AB (Fig. 37A). Con este experimento se muestra que existe unión del ODN a las proteínas del suero AB. El comportamiento del complejo DEC+/ODN y el suero AB se estudió con el dendriplex DEC+ NN8/ODN PPT a distintos tiempos en presencia de diferentes concentraciones de proteínas del suero AB (Fig. 38).

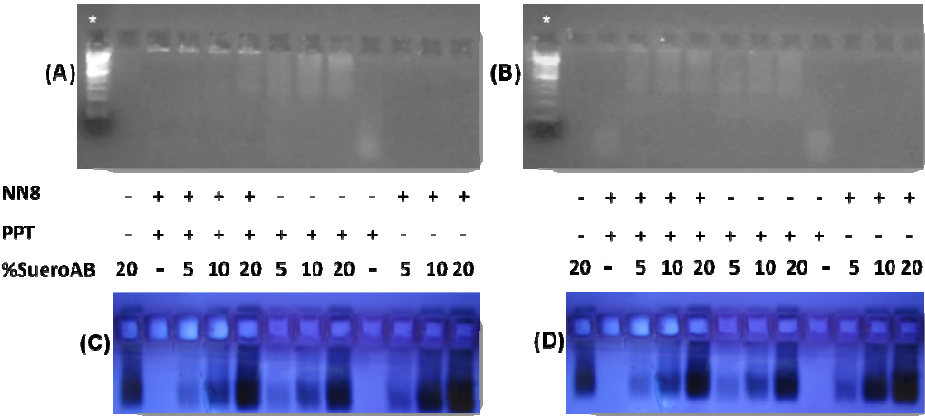


Fig. 38 Interacción entre el dendriplex y el suero humano AB. (A) Estudio del dendriplex DEC+ NN8/ODN PPT a ratio 2/1 en presencia de distintas concentraciones de suero AB tras 4 h en condiciones de cultivo. (B) El dendriplex se mantuvo en CC24 h antes de llevar a cabo la electroforesis. (C) y (D) representan el mismo gel teñido con azul Paragón para evidenciar la presencia de las proteínas. *Marcador en escalera de ADN de 100 pb.

En el gel de la figura 38A se observa el efecto de la presencia de las proteínas del suero AB sobre el dendriplex DEC+ NN8/ODN PPT a ratio 2/1. El DEC+ NN8 retuvo la migración del ODN PPT, pero al aumentar la concentración de suero AB se observó la aparición de una señal tenue de liberación del ODN PTT. Este dato confirmó que cierta cantidad del ODN se liberaba del dendriplex a las 4 h y que un incremento de la concentración de proteínas del suero AB favorecía dicho efecto. En la figura 38B se observa la liberación del ODN PPT e interacción de éste con las proteínas del suero AB a las 24 h. El incremento de la concentración de suero AB mostró claramente el efecto de la interacción ODN PPT-suero AB. Se observó que las proteínas del suero AB corrían a la misma altura en todas las condiciones del experimento, independientemente de la presencia del DEC+ NN8, que no consiguió retener las proteínas del suero AB en el pocillo. Por tanto, existe una protección del DEC+ NN8 al ODN PPT de la unión a proteínas del suero AB en las primeras 4 h, observándose una interacción del ODN PPT liberado del dendriplex con las proteínas del suero AB a las 24 h.

4.6. ESTUDIOS DE ESPECTROFLUORIMETRÍA

Los estudios de fuerzas de unión existentes entre DEC+, ODN y BSA se realizaron en el Departamento de Biofísica de la Universidad de Lodz (Polonia) [185-187].

4.6.1. Estudio de la interacción entre los DEC+ y ODN

4.6.1.1. Dendriplex DEC+/ODN

Se estimó la interacción entre los DEC+ y los ODN monitorizando los cambios en la polarización de fluorescencia de la fluoresceína unida al extremo 5' de los ODN, cuando se enfrentaron a concentraciones crecientes de DEC+ (Fig. 39 y tabla 3).

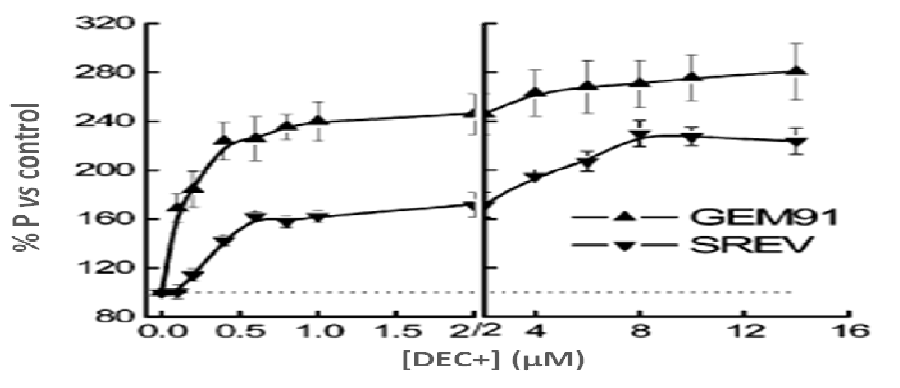


Fig. 39 Cambios en la polarización de fluorescencia de los ODN GEM91 y SREV al incrementar la concentración de DEC+. La línea de puntos indica el 100 % de polarización y corresponde a la polarización de fluorescencia del ODN en ausencia de dendrímero. Los datos están representados en dos escalas en el eje de abscisas, de 0-2 μM y de 2-14 μM . [ODN] = 0,1 μM .

Tabla 3. Interacción entre los DEC+ y los ODN GEM91 y SREV.

(A)			(B)	
DEC+	GEM91	SREV	DEC+/GEM91	DEC+/SREV
N8	0	0	-	-
N16	3	6	129.1 \pm 4.0	169.3 \pm 10.9
NN8	4	7	159.6 \pm 6.8	183.1 \pm 14.3
NN16	4	7	142.3 \pm 4.3	223.7 \pm 15.4

(A) Número de DEC+ por molécula de ODN. **(B)** Cambios en la polarización de fluorescencia (% P vs control) de los ODN con la concentración de DEC+ al ratio molar DEC+/ODN del apartado (A). P = 100 % corresponde a la polarización de fluorescencia de los ODN en ausencia de dendrímero.

Las interacciones dependían del tipo de ODN y del tipo de DEC+ utilizado. Se observaron dos procesos de unión: primero, la unión específica entre ODN y DEC+ (interacción fuerte del DEC+ con las regiones del ODN) cuando el ratio molar (DEC+/ODN) fue de (2-7)/1; segundo, micelación (interacción débil o agregación) del dendriplex con moléculas de DEC+ cuando el ratio molar fue superior a 7/1 (Fig. 39). La micelación fue característica del DEC+ N8, mientras que los otros DEC+ mostraron una unión específica. Esto se confirmó con los experimentos de DEC+ vs ANS (apartado 4.6.5.). En la tabla 3A se observa que todos los DEC+ a excepción del DEC+ N8 se pudieron estudiar por la técnica de polarización de fluorescencia y que el número de moléculas de DEC+ para el ODN SREV fue superior que para el ODN GEM91 (28b y 25b respectivamente). Además, en la tabla 3B se observó la mayor interacción de SREV al formar el dendriplex con los DEC+ N8, N16 y NN8 y el dendriplex DEC+ NN16/ODN SREV fue el que mayor valor de polarización mostró.

4.6.1.2. Interacción DEC+/ADN_{TT}

Para evaluar la interacción de los DEC+ con el ADN se realizó un análisis del desplazamiento del BE intercalado en el ADN. Cuando el BE interacciona con los ácidos nucleicos su λ_{max} se desplaza al azul y se produce un aumento de la intensidad de fluorescencia. En la figura 40 se observa el espectro de emisión de fluorescencia en ausencia o presencia del DEC+ NN16.

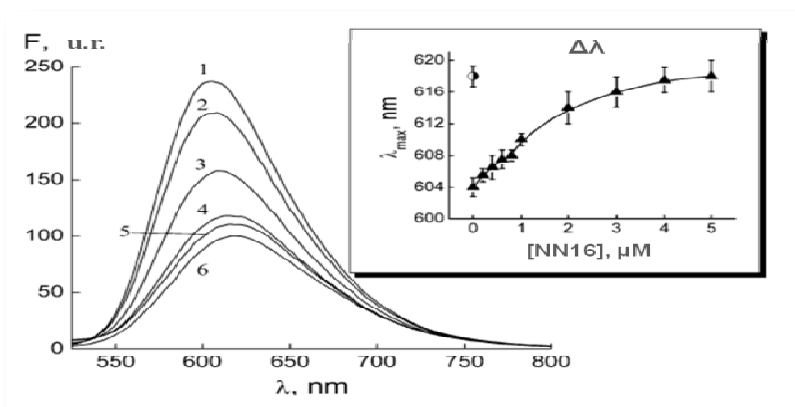


Fig. 40 Interacción de los DEC+ con el ADN_{TT}. El espectro de emisión de fluorescencia representa la fluorescencia del BE puro (6), BE/ADN_{TT} (1) y BE/ADN_{TT} más DEC+ NN16 a 0,4 μM (2), 1 μM (3), 2 μM (4) y 5 μM (5). El espectro a 0,2; 0,6; 3 y 4 μM no se encuentra representado. El recuadro Δλ muestra la dependencia de la emisión máxima de fluorescencia del BE/ADN_{TT} con la concentración de DEC+ NN16 (▲). El círculo representa la λ_{max} para el BE puro. u.r. <> unidades relativas.

El DEC+ NN16 no afectó a la forma o intensidad del espectro de BE incluso a las concentraciones más altas, excluyendo el efecto de la interacción BE/DEC+ (Fig. 40). La adición de DEC+ NN16 al complejo BE/ADN_{TT} disminuyó la intensidad de la emisión de fluorescencia del BE, reflejando una competencia del DEC+ NN16 por la unión al ADN_{TT}. La λ_{max} de BE puro fue de 618 nm y al unirse a ADN_{TT}, λ_{max} se desplazó al azul (604 nm). En el recuadro $\Delta\lambda$ se detalló el desplazamiento al rojo que se produjo al aumentar la concentración de DEC+ NN16, desde $\lambda_{\text{max}} = 604$ nm hasta $\lambda_{\text{max}} = 618$ nm ([NN16] = 5 μM). Se obtuvieron resultados similares cuando se analizaron los DEC+ NN8 y N16 pero no para el DEC+ N8 (Fig. 41).

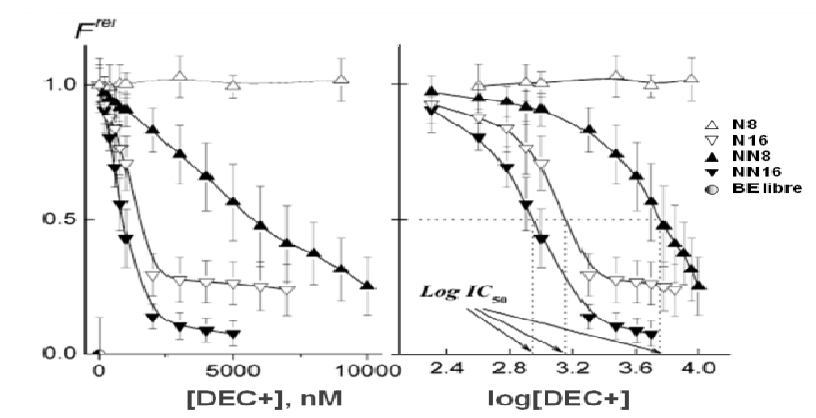


Fig. 41 Desplazamiento del BE unido al ADN_{TT} debido a la presencia de los DEC+. Se midió la fluorescencia relativa (F^{rel}) como se indica en el apartado 3.4.3.1.2. El DEC+ N8 fue el único de los DEC+ que presentó un patrón diferente.

Estos resultados mostraron como los DEC+ se unían al ADN_{TT} y desplazaban al BE de los sitios de unión. Las constantes de asociación de los DEC+ N16, NN8 y NN16 se calcularon usando estas mismas aproximaciones (Tabla 4).

Tabla 4. Constantes de asociación de los DEC+ con ADN_{TT}.

DEC+	LogIC50 (ver fig. 19)	IC50 (= [D]50) μM	$K_a^{\text{DEC+}} \times 10^{-5}$ (M^{-1})	$K_a^{\text{I}} \times 10^{-5}$ (M^{-1})
N16	3.16 (3.06-3.26)	1.45 (1.15-1.82)	2.98 (2.38-3.76)	3.67 (2.92-4.62)
NN8	3.76 (3.60-3.93)	5.75 (3.98-8.51)	0.75 (0.51-1.09)	0.92 (0.62-1.34)
NN16	2.95 (2.83-3.08)	0.89 (0.68-1.20)	4.85 (3.60-6.36)	5.98 (4.43-7.82)

Se utilizaron los resultados de la figura 41 para obtener los valores de las constantes, tal y como se describe en el apartado 3.4.3.1.2.

La interacción del DEC+ N8 fue tan débil que no se pudo estimar las constantes de asociación utilizando el BE. Los datos de la tabla 4 reflejaron unas constantes de asociación mayores para los DEC+ con 16 grupos terminales, siendo más alta para el DEC+ NN16 que para el DEC+ N16.

4.6.2. Estudio de la interacción de BSA y ODN

La figura 42 muestra los cambios en la polarización de fluorescencia de los ODN GEM91 y SREV cuando se enfrentaron a concentraciones crecientes de BSA.

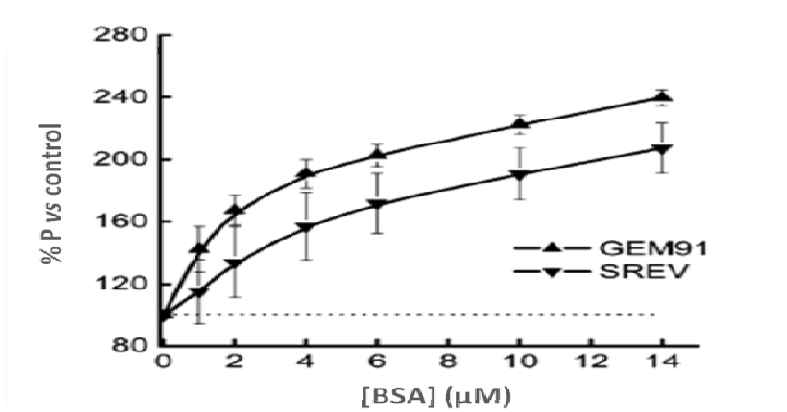


Fig. 42 Cambios en la polarización de fluorescencia de los ODN GEM91 Y SREV al incrementar la concentración de BSA. La línea de puntos indica el 100 % de polarización y corresponde a la polarización de fluorescencia del ODN en ausencia de BSA. [ODN] = 0,1 μM

Estos resultados confirmaron los resultados obtenidos por la técnica de electroforesis donde se evidenció la interacción ODN-BSA (apartado 4.5.1.)

4.6.3. Estudio de la interacción de DEC+ y BSA

La monitorización de los cambios intrínsecos en la fluorescencia de la BSA permite el seguimiento de las alteraciones en la estructura de la proteína en presencia de DEC+ [186]. La BSA tiene dos residuos de triptófano, uno se encuentra situado en la parte baja del hueco hidrofóbico del subdominio IIA (Trp²¹³) y el otro en la zona

superficial de la molécula en el subdominio IB (Trp¹³⁴) [193]. En la figura 43 se muestra un ejemplo de las medidas de interacción realizadas con el DEC+ NN8 con BSA y BSA-AF.

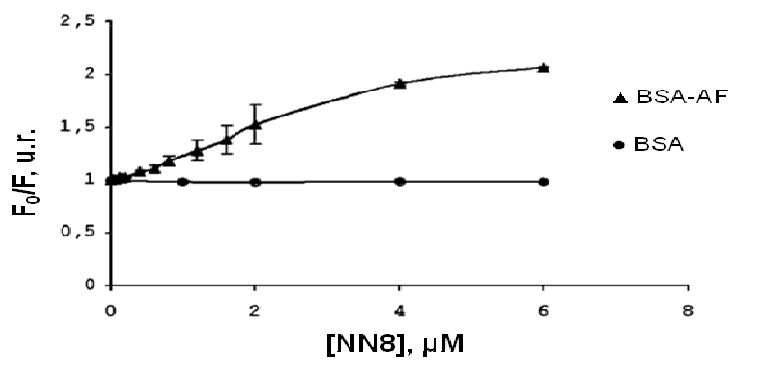


Fig. 43 Curvas de extinción de fluorescencia del BSA y BSA-AF. [BSA] = 5 μM, [BSA-AF] = 20 μM. λ_{ex} = 295 nm y λ_{em} = 350 nm. u.r. <> unidades relativas. λ_{ex} = 295 nm y λ_{em} = 350 nm. u.r. <> unidades relativas.

Se observó que los DEC+ no afectaron a la extinción de la fluorescencia del triptófano interno y externo de la proteína, ni a la polarización de fluorescencia [188]. Por lo tanto, los DEC+ no afectaron de forma significativa a la conformación natural de la proteína en el rango de concentraciones estudiado. Por el contrario, los DEC+ extinguieron la fluorescencia de Alexa Fluor 488, el fluoróforo unido a la superficie de la BSA. Estos datos indicaron que las interacciones entre los DEC+ y BSA son débiles y ocurren preferentemente en la superficie de la proteína.

Se utilizaron agentes de extinción conocidos para estudiar el efecto de los DEC+ en la interacción BSA-Extintor. Para ello, se utilizó acrilamida (extintor polar neutro que puede penetrar en el interior de la proteína por difusión debido a fluctuaciones en la conformación de los polipéptidos), CsCl y KI (extintores iónicos que suprimen la fluorescencia del Trp mediante un efecto por iones pesados que requiere la colisión entre iones Cs+ o I-, respectivamente, y la excitación del anillo indol). Los extintores iónicos no penetraron en la matriz de la proteína, por lo que la extinción de la fluorescencia se debía principalmente al residuo de triptófano superficial [186].

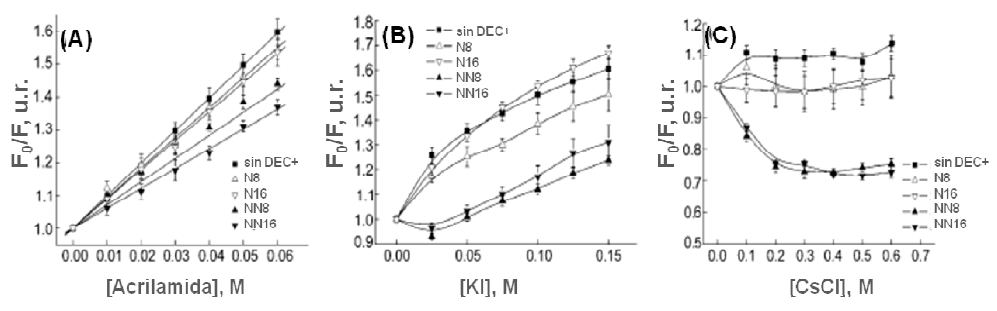


Fig. 44 Curvas de extinción de fluorescencia del BSA, debido a (A) Acrilamida (B) KI (C) CsCl en ausencia y presencia de dendrímero. [BSA] = 5 μ M, [DEC+] = 100 μ M. λ_{ex} = 295nm y λ_{em} = 350nm. u.r. <> unidades relativas.

En la figura 44A se observa la extinción de la fluorescencia del BSA por efecto de la acrilamida en presencia o ausencia de los DEC+. Las curvas de extinción fueron lineales y los valores máximos de extinción se produjeron en ausencia de DEC+. Los DEC+ N8 y N16 presentaron un patrón similar a la extinción sin DEC+ en el medio, mientras que los DEC+ NN8 y NN16 disminuyeron el efecto de la acrilamida. La figura 44B muestra el efecto de KI en la fluorescencia de BSA, distinguiéndose dos secciones: una inicial cuasilineal (0-0.025 M) y otra lineal (0.025-0.15 M), lo que evidenció una naturaleza de la extinción de la fluorescencia estática (adherencia del extintor) y dinámica (colisión). Se observó un proceso similar de la extinción de fluorescencia con CsCl que con KI, siendo este efecto más intenso debido a que desaparece el efecto de extinción de la fluorescencia por los Cs+ en presencia de los DEC+ NN8 y NN16 (Fig. 44C). Las constantes de extinción obtenidas de las figura 44A se representan en la tabla 5.

Tabla 5. Constantes de extinción de fluorescencia del BSA por acrilamida en presencia de los DEC+.

DEC+	KSV (AC), (M) ⁻¹
-	9.92 ± 1.01
N8	9.19 ± 0.94
N16	8.89 ± 1.10
NN8	7.07 ± 0.61
NN16	6.05 ± 0.71

4.6.4. Estudio de la interacción DEC+/ODN + BSA y BSA/ODN + DEC+

Una vez formados los dendriplexes, se añadieron alícuotas de los mismos a soluciones de BSA y se monitorizaron los cambios en la polarización de fluorescencia de los ODN (Tabla 6A).

Tabla 6. Interacción dendriplexes DEC+/ODN + BSA y BSA/ODN + DEC+.

(A)			(B)	
DEC+	DEC+/GEM91 + BSA	DEC+/SREV + BSA	BSA/GEM91 + DEC+	BSA/SREV + DEC+
N8	75 ± 6	72 ± 12	107 ± 6	106 ± 8
N16	51.3 ± 2	75 ± 6	165 ± 12	123 ± 6
NN8	100 ± 3	100 ± 5	153 ± 11	135 ± 6
NN16	104 ± 8	97 ± 4	177 ± 3	112 ± 5

(A) Cambios en la polarización de los dendriplexes (DEC+/ODN) al añadir BSA a ratio molar BSA/DEC+/ODN de 10/7/1. P = 100 % corresponde a la polarización de fluorescencia del dendriplex en ausencia de BSA. **(B)** Cambios en la polarización de fluorescencia de los complejos BSA/ODN frente a la adición de DEC+ a ratio molar DEC+/BSA/ODN de 7/10/1. P = 100 % corresponde a la polarización de fluorescencia del complejo BSA/ODN en ausencia de DEC+. (A), (B): [ODN] = 0,1 µM

En presencia de BSA, la polarización de la fluorescencia de los dendriplexes DEC+ N8/GEM91 o SREV y DEC+ N16/GEM91 o SREV disminuyó de 100 % a 75 %, mientras que los dendriplexes DEC+ NN8/GEM91 o SREV y DEC+ NN16/GEM91 o SREV no variaron significativamente. Los resultados indicaron que la BSA alteró las micelas formadas por los primeros dendriplexes interaccionando fuertemente con el ODN y el DEC+. Por el contrario, la BSA no afectó a los dendriplexes formados por los DEC+ NN8 y NN16. La interacción entre la BSA y los dendriplexes también se estudió formando complejos BSA/ODN y añadiendo concentraciones crecientes de DEC+. Se monitorizó la polarización de la fluorescencia del ODN (Tabla 6B). La adición de DEC+ aumentó la polarización de la fluorescencia del ODN. Este efecto fue similar a la interacción DEC+/ODN en ausencia de BSA, estudiado en el apartado 4.6.1.1. En este caso, en comparación con los valores de la tabla 3, se observó que a igual ratio molar, el ODN GEM91 interaccionaba más con los DEC+ que el ODN SREV. Se produjo una competencia entre DEC+ y BSA por la unión al ODN, reflejándose en una alteración del complejo BSA/ODN en presencia de DEC+ (formación de un complejo más estable con el ODN).

4.6.5. Estudio de la interacción de DEC+ y ANS

Se evaluó la interacción de los DEC+ usando la fluorescencia extrínseca de ANS para detectar los cambios conformacionales asociados. Los cambios observados dependieron de la concentración y estructura del DEC+ (Fig.45 y Tabla 7).

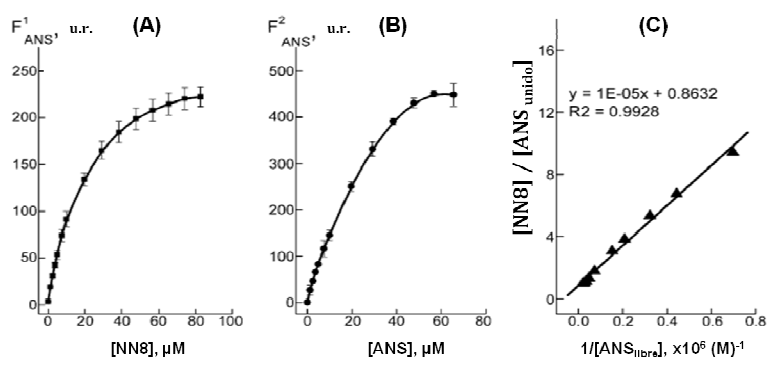


Fig. 45 Análisis de Scatchard-Klotz de DEC+ NN8 vs ANS. (A) Dependencia de la intensidad de fluorescencia de ANS de la concentración del DEC+ NN8, [ANS]= 5 μM . (B) Dependencia de la intensidad de fluorescencia de ANS a concentración constante del DEC+ NN8 = 10 μM . (C) Gráfica de Scatchard-Klotz, $\lambda_{\text{ex}}=370\text{nm}$ y $\lambda_{\text{em}}=480\text{nm}$. u.r. <> unidades relativas.

Se observó un incremento no lineal de la intensidad de fluorescencia hasta llegar a una meseta a concentraciones altas del DEC+ NN8 y ANS (Fig. 45A y B). La curva de Scatchard-Klotz fue prácticamente lineal (Fig. 45C). Al añadir el DEC+ se observó un incremento notable en la intensidad de fluorescencia y un desplazamiento al azul (*blueshift*), que se correspondía con un desplazamiento de la emisión máxima a menores longitudes de onda (Tabla 7). Estos cambios indicaron la interacción de la molécula de ANS con los DEC+.

Tabla 7. Parámetros de unión DEC+/ANS.

DEC +	$K_b \times 10^{-5} \text{ (M)}^{-1}$	n	DEC+/ANS	$\Delta\lambda$ (desde 520 nm hasta...)
N8	0.7 – 2.0	0.1 – 0.3	~ 8:1	473 \pm 1.9
N16	0.6 – 2.1	0.3 – 0.4	~ 3:1	470 \pm 1.7
NN16	1.0 – 1.5	0.8 – 1.0	~ 1:1	481 \pm 1.4
NN8	1.0 – 1.4	0.7 – 1.3	~ 1:1	481 \pm 1.2

Constantes de unión (K_b), número de centros de unión (n), ratio molar aproximado de DEC+/ANS y desplazamiento del máximo de fluorescencia emitida por ANS en la interacción DEC+/ANS.

4.7. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR DE LOS DENDRÍMEROS CATIÓNICOS

La biocompatibilidad de los DEC+ se evaluó mediante diversas técnicas utilizadas para discriminar las moléculas potencialmente peligrosas para su uso en cultivos celulares y optimizar el uso de las mismas en diferentes aplicaciones de la nanomedicina, como por ejemplo la terapia génica.

Se estudió el rango de biocompatibilidad de los DEC+ N8, N16 y NN8 en CMSP por ensayo de MTT, analizando la reducción de la actividad mitocondrial de las CMSP debido a la presencia de los DEC+, fijando la dosis máxima de DEC+ que se podría utilizar en condiciones fisiológicas (Fig. 46).

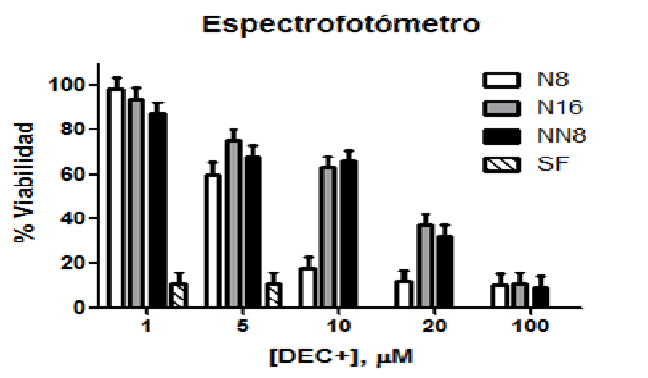


Fig. 46 Ensayo de MTT. Se evaluó la actividad mitocondrial de las CMSP en presencia de los DEC+ N8, N16 y NN8 y el transfectante comercial Superfect® en CMSP a concentraciones entre 1 y 100 µM tras 48 h de tratamiento. La viabilidad se expresa como porcentaje frente a la viabilidad de las células sin tratar.

El límite de toxicidad para los DEC+ N16 y NN8 fue de 5 µM, pero el DEC+ N8 mostró mayor toxicidad. El control Superfect® mostró gran toxicidad a 1 µM (Fig. 46).

Se estudió la toxicidad de los DEC+ N8, NN16 y NN8 vs dendriplexes por un ensayo de incorporación de azul tripán. Se observó un ligero aumento de la toxicidad cuando se trataron las CMSP con los DEC+ en comparación con el tratamiento con los dendriplexes. El PAMAM G4 y el Superfect® mostraron una toxicidad alta y presencia de agregados a las concentraciones utilizadas (Fig. 47).

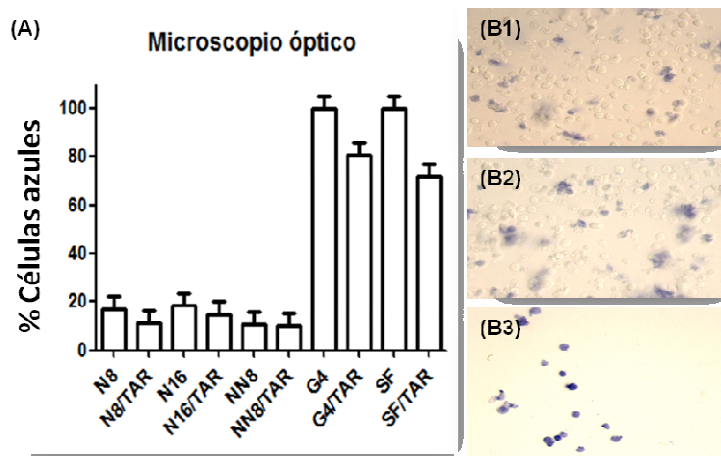


Fig. 47 Ensayo de Azul tripán. (A) Toxicidad celular de los DEC+ N8, N16 y NN16, de los dendriplexes DEC+N8/ODN TAR, DEC+N16/ODN TAR y DEC+NN8/ODN TAR, PAMAM G4 y Superfect® en cultivos de CMSP tras 72 h de tratamiento. La toxicidad se expresa como porcentaje de células azules frente a las células viables del control. [DEC+], [G4] y [SF] a 5, 100 y 1 μ M, respectivamente. (B) Campos representativos de las células tratadas con (B1) RPMI, (B2) dendriplex DEC+ N8/ODN TAR y (B3) SF. Los datos representan la media \pm SEM de un experimento por triplicado.

Estos resultados se confirmaron por citometría de flujo. Se evaluaron el tamaño (FW) y complejidad (SD) de las CMSP y se realizó un marcaje de apoptosis/necrosis (Anexina-V-PE/7-AAD) para discriminar las células vivas de las apoptóticas o necróticas debido a la presencia de los DEC+ N8, N16 y NN8 (Fig. 48).

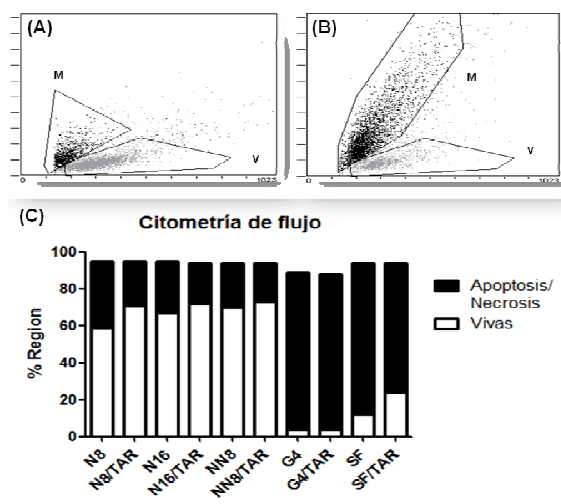


Fig. 48 Ensayo de Apoptosis/Necrosis por citometría de flujo. (A) y (B) representan las CMSP vivas (V) y muertas (M) por citometría de flujo tras 72h en contacto con los DEC+ y PAMAM G4, respectivamente. SD (Complejidad) vs FW (Tamaño) se representa en Y vs X. (C) Porcentajes de las regiones vivas y apoptosis/necrosis (marcaje de Anexina-V-PE y 7AAD) para los DEC+, dendriplexes, G4 y SF, representados frente al control. [DEC+], [G4] y [SF] a 5, 100 y 1 μ M, respectivamente.

Cualquier nanomolécula se puede comportar como un estímulo mitogénico en una determinada línea celular. Se analizaron los DEC+ N8, N16 y NN8 para descartar su posible capacidad mitogénica en CMSP. Se utilizó *PHA* como control de proliferación y se observó que ninguno de los DEC+ tenía capacidad mitogénica (Fig. 49).

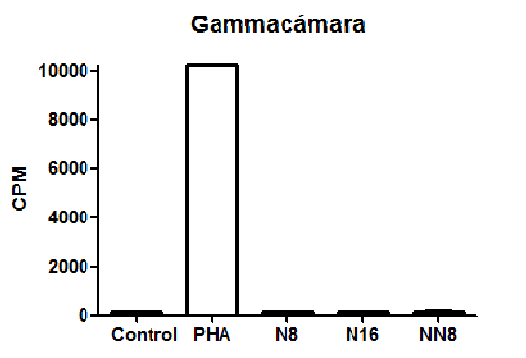


Fig. 49 Ensayo de mitogenicidad. Se evaluó la capacidad mitogénica de los DEC+ N8, N16 y NN16 a 5 μ M durante 5 días mediante la captación de timidina tritiada incorporada por minuto (CPM). PHA a 2 μ g/mL.

Se sintetizó un dendrímero nuevo de estructura carbosilano que reunía las condiciones del DEC+ NN8 pero que duplicaba el número de cargas por molécula (NN16), disminuyendo de esta forma el número de moléculas de DEC+ necesarias para formar complejo con los ODN. En primer lugar se estudió la viabilidad del DEC+ NN8 y del DEC+ NN16 en CMSP por ensayo de MTT (Fig. 50).

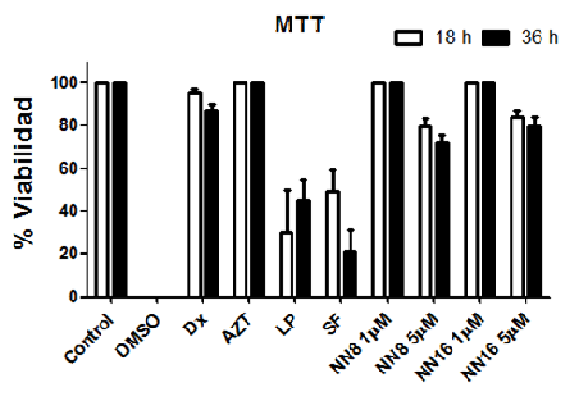


Fig. 50 Viabilidad de las CMSP con DEC+ NN8 y DEC+ NN16 en CMSP. Dx (Dextrano, 5 μ M), AZT (Zidovudina, 1 μ M), Lp (lipofectin® utilizado según las instrucciones del fabricante); SF (Superfect®) a 1 μ M. DMSO al 15 % inhibe la actividad mitocondrial de las CMSP. La viabilidad se expresa como porcentaje frente a la viabilidad del control. Viabilidad aceptable superior al 80 %. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Se observó que el DEC+ NN8 y el DEC+ NN16 no eran tóxicos hasta una concentración de 5 μ M en CMSP tras 18 h y 36 h de tratamiento. Como control de toxicidad se utilizó el DMSO y de no toxicidad el dextrano y AZT a 1 μ M. Estos resultados mostraron claramente la biocompatibilidad del nuevo DEC+ NN16. Además, se confirmó la reducción de la actividad mitocondrial que se produce en presencia de los transfectantes Lipofectin® y Superfect® a concentración de 1 μ M (Fig. 50).

También se estudió la viabilidad del DEC+ NN8 y DEC+ NN16 utilizando el ensayo de toxicidad basado en la liberación de LDH (Fig. 51).

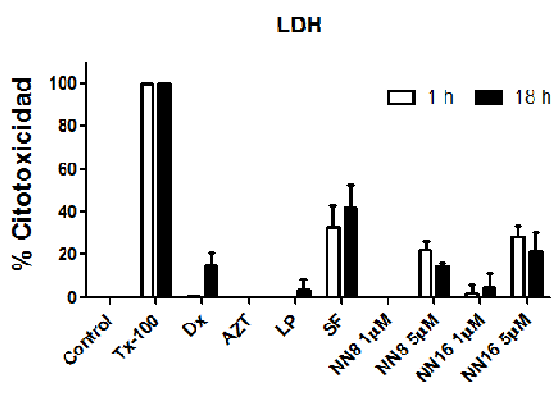


Fig. 51 Citotoxicidad del NN16 en CMSP. Dx (Dextrano, 5 μ M), AZT (Zidovudina, 1 μ M), Lp (Lipofectin®, 10 μ L) SF (Superfect® a 1 μ M). Tx-100 (Tritón x-100) al 0,2 % produce un 100 % de LDH libre en el sobrenadante de CMSP. La citotoxicidad se expresa como porcentaje de LDH libre frente a la viabilidad del control. Citotoxicidad positiva a partir del 10 %. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Los DEC+ NN8 y NN16 mostraron toxicidad a partir de 5 μ M, utilizando el ensayo de liberación de LDH, tras la incubación de las CMSP durante 1 h y 18 h. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por el ensayo de MTT. Así, se estableció la biocompatibilidad hasta 5 μ M. Como está descrito, a estas concentraciones y tiempos el AZT y el dextrano no fueron tóxicos. El Superfect® fue tóxico a las concentraciones y tiempos estudiados.

Con el objetivo de estudiar si el DEC+ era mitogénico, se realizó un ensayo de proliferación en CMSP cuantificando la cantidad de BrdU incorporada en las CMSP. En este ensayo se mostró que el DEC+ NN16 no inducía proliferación de las CMSP a las concentraciones de 1 a 5 μ M tras 4 días de tratamiento (Fig. 52).

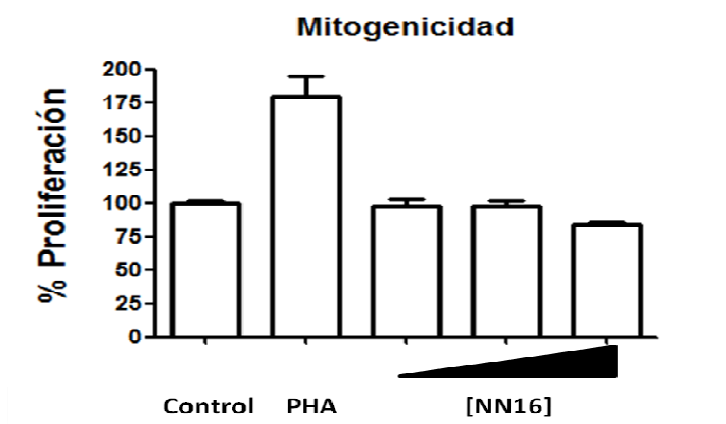


Fig. 52 Ensayo de linfoproliferación. Se utilizó PHA a 2 $\mu\text{g/mL}$ como control positivo de proliferación de CMSP. La cuantificación de BrdU incorporada en las CMSP se llevó a cabo tras 4 días de tratamiento. Los porcentajes de proliferación representan la BrdU incorporada con respecto al control (células no tratadas) y corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Finalmente se realizó un ensayo de hemaglutinación y hemólisis, donde se observó al microscopio óptico el estado de los hematíes en presencia del DEC+ NN16 y se evaluó la liberación de hemoglobina al sobrenadante de cultivo (Fig. 53)

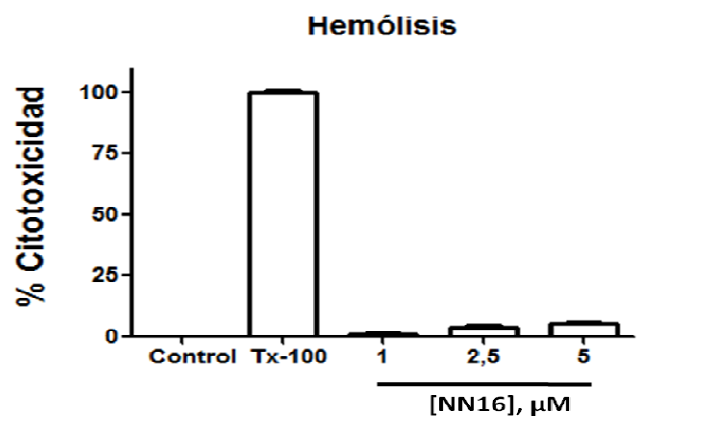


Fig. 53 Ensayo de hemólisis. Viabilidad celular de los hematíes tras 1 h en contacto con el DEC+ NN16. Se utilizó Tx-100 (Tritón x-100) al 0.2 % como control positivo de citotoxicidad (100 % de hemoglobina libre en sobrenadante). Los porcentajes de citotoxicidad representan la hemoglobina liberada con respecto al control (no tratadas) y corresponden a la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

No se obtuvo toxicidad con el DEC+ NN16 a la concentración de 5 μM y las células tratadas presentaron buena distribución, al igual que las células no tratadas, no observándose hemaglutinación a ninguna de las concentraciones utilizadas.

El objetivo final fue utilizar el DEC+ NN16 como agente transfectante, por lo cual se realizaron curvas dosis/respuesta para evaluar la actividad mitocondrial por MTT en presencia de distintas concentraciones del DEC+ en cultivos primarios (CMSPs, CD y MΦ) y líneas celulares (SupT1, U87, SK-N-MC, K-562 y JEG-3) susceptibles de ser infectadas por el VIH (Fig. 54).

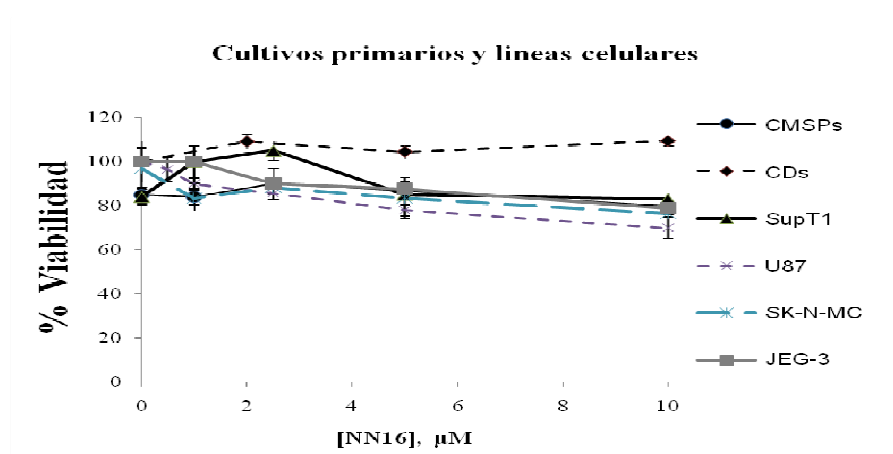


Fig. 54 Viabilidad del DEC+ NN16 por MTT. Se evaluó la viabilidad celular a las 24 h en cultivos primarios (CD y CMSP) y líneas celulares (SupT1, U87, SN-N-MC y JEG-3). Los valores corresponden a tres experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm SEM).

Se observó que el DEC+ NN16 no era tóxico en los cultivos primarios y en las líneas celulares tras 24 h de tratamiento hasta una concentración de 5 μ M y que empezaba a ser tóxico a la concentración de 10 μ M (Fig. 54).

Se analizó la citotoxicidad del DEC+ NN16 utilizando el ensayo de liberación de LDH (Fig. 55). Los resultados mostraron que el DEC+ NN16 no fue tóxico hasta la concentración de 5 μ M en distintas líneas celulares y cultivos tras 3 h y 5 h de tratamiento y se seleccionó la dosis de 5 μ M como dosis biocompatible.

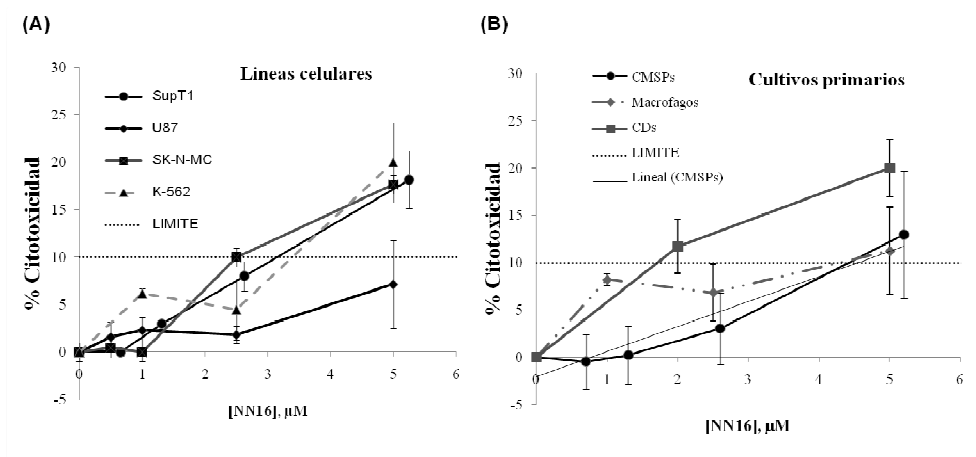


Fig. 55 Citotoxicidad del NN16 por LDH. Se evaluó la viabilidad celular entre 3 h y 5 h de distintas **(A)** líneas celulares y **(B)** cultivos primarios. El límite de un 10 % de citotoxicidad se estableció como el máximo aceptable para no ser tóxico. Los valores corresponden a tres experimentos independientes realizados por triplicado (media \pm SEM).

4.8. ESTUDIOS DE TRANSFECCIÓN

La eficiente inhibición de la replicación viral depende de la eficacia de transfección del material nucleico utilizado. Se evaluó la capacidad de los ODN antisentido para atravesar las membranas plasmática y nuclear de las CMSP y se comparó con la entrada de los ODN formando complejo con los DEC+.

4.8.1 Internalización del ODN en CMSP

Los ODN son moléculas aniónicas que no atraviesan de forma eficiente las membranas hidrofóbicas de las células [194]. A diferencia de lo publicado, los ODN utilizados en esta Memoria mostraron una alta capacidad para atravesar la membrana plasmática y nuclear de las CMSP, por lo que se estudió las diferencias de captación de ODN fluoresceinado entre CMSP activadas y no activadas. Además, debido a que la utilización de la terapia génica se está desarrollando tanto en adultos como en niños, se incluyeron en el estudio CMSP de cordón umbilical.

El proceso de atravesar la membrana plasmática y nuclear de los ODN fue tiempo/dependiente (Fig. 56). Tras 4 h, el ODN-FITC se localizó en el citoplasma celular y a las 24 h en el núcleo, como se muestra más adelante en el análisis celular (Fig. 58). El patrón de fluorescencia fue difuso (fluorescencia no focalizada en puntos concretos del interior celular) sin formación de agregados (puntos intensos y aislados de fluorescencia) y el porcentaje de células con ODN-FITC tras 24 h fue en algunos casos superior al 80 % (Fig. 56C).

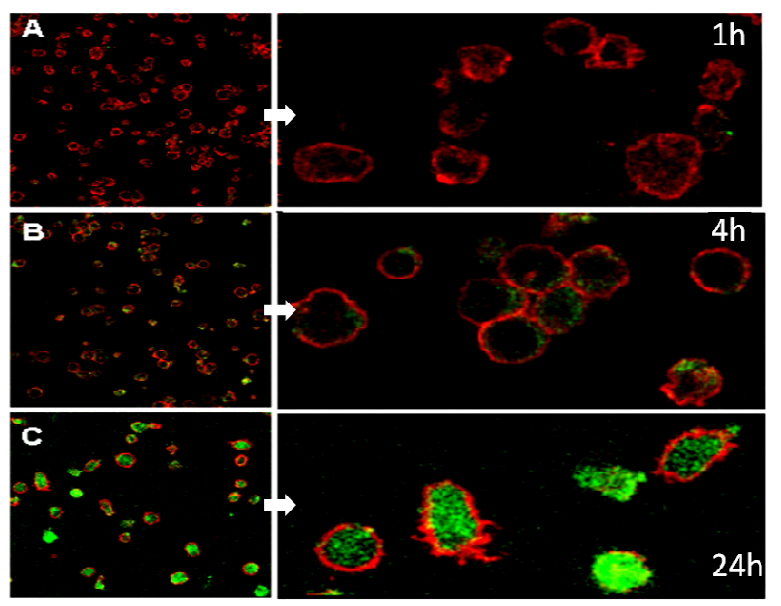


Fig. 56 Internalización tiempo-dependiente de los ODN en CMSP de adulto. Los ODN GEM91, SREV, TAR evaluados mostraron el mismo patrón de entrada. En este ejemplo, se representa el ODN TAR marcado en FITC (verde) y el marcaje de membrana con anti-CD45-Texas Red (rojo). [ODN] = 1 μ M.

La captación de ODN en CMSP se incrementa en presencia de mitógenos [195]. Por esta razón, se estudió la internalización del ODN en CMSP de adulto y cordón umbilical en ausencia y presencia de PHA y no se encontraron diferencias en la entrada del ODN TAR en ambos tipos celulares a los tiempos estudiados (Fig. 57). Por esta razón se utilizaron CMSP de cordón umbilical y de adulto para los estudios de inhibición de la replicación del VIH.

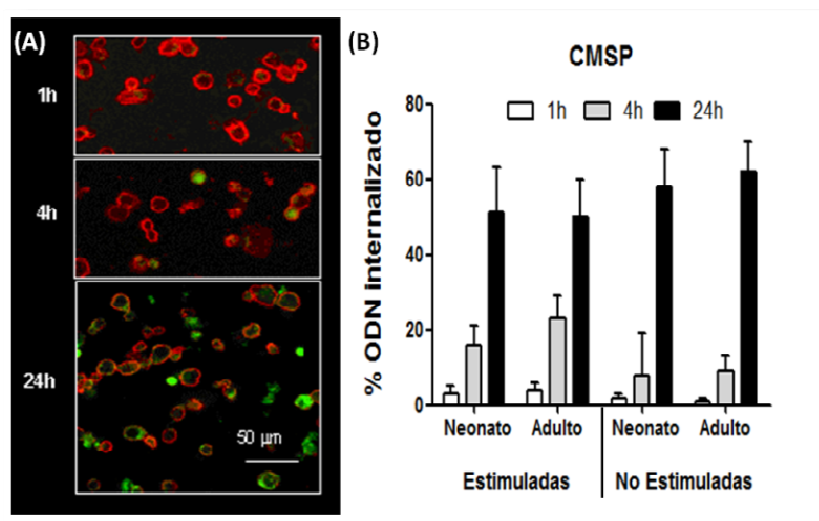


Fig. 57 Estudio de la internalización del ODN TAR en CMSP de adultos y neonatos por microscopía confocal. **(A)** Representación de la entrada del ODN TAR en CMSP de cordón umbilical no estimuladas. [ODN] = 1 μM . **(B)** Porcentaje de ODN TAR internalizado en CMSP a distintos tiempos. Estimuladas 48 h en presencia de 2 $\mu\text{g/mL}$ de PHA y 50 UI/mL de IL-2. Los resultados se expresan como la media \pm SD de 3 donantes. Marcaje de membrana con anti-CD45-Texas Red (rojo).

El análisis de una célula aislada mediante microscopía confocal mostró la localización nuclear tras 24 h, la cual se confirmó al realizar un corte en el eje XY en el plano medio de una célula seleccionada tras analizar la fluorescencia presente a lo largo de una línea que lo atravesaba (Fig. 58).

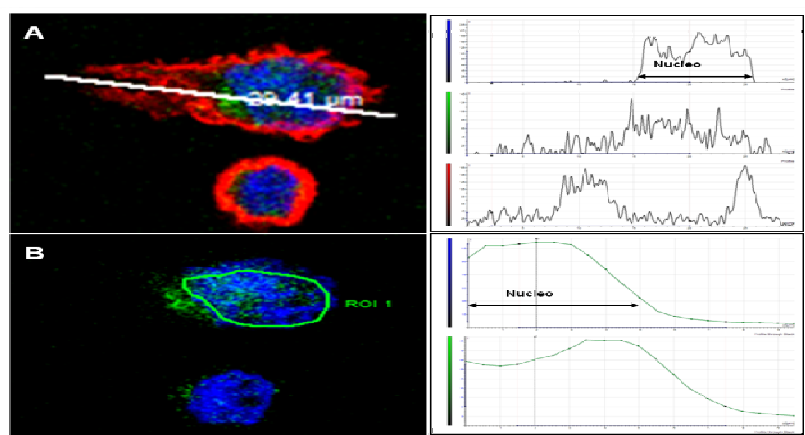


Fig. 58 Representación de una CMSP tratada con ODN GEM91. **(A)** línea en un corte en el plano medio XY y representación en histogramas de las emisiones de fluorescencia a lo largo de la misma. **(B)** Sobre varios cortes en Z se selecciona un área alrededor del núcleo y se representan en histogramas las emisiones de fluorescencia en todos los cortes dentro de esa área. 24 h post-tratamiento. Membrana marcada con anti-CD45-Texas Red (rojo) y membrana marcada con DAPI (azul).

La fluorescencia del ODN fluoresceinado colocalizaba con la fluorescencia del núcleo marcado con DAPI (Fig. 58A). Cuando se realizó un análisis similar pero tomando una región de interés (*ROI*) dibujada alrededor del núcleo a lo largo de varias secciones en el eje Z, se observó cómo el verde colocalizó con el azul, estando presente en el citoplasma hasta llegar a la membrana (Fig. 58B). Los resultados fueron los mismos independientemente de la longitud del ODN estudiado (desde 15 a 28 bases).

4.8.2 Internalización del ODN en monocitos

Se estudió la entrada de los ODN en monocitos. En la figura 59 se muestran las diferencias significativas relativas a la entrada del ODN TAR en linfocitos y monocitos. La entrada en monocitos fue superior en todos los casos, como era de esperar debido a su mayor capacidad de endocitosis. Las CMSP activadas presentaron una mayor capacidad de captación de ODN en todos los tiempos analizados. No se encontraron diferencias entre la entrada en linfocitos de sangre de cordón o de adulto en ninguna de las condiciones analizadas, lo que está en concordancia con los resultados obtenidos por microscopía confocal (Fig. 57B).

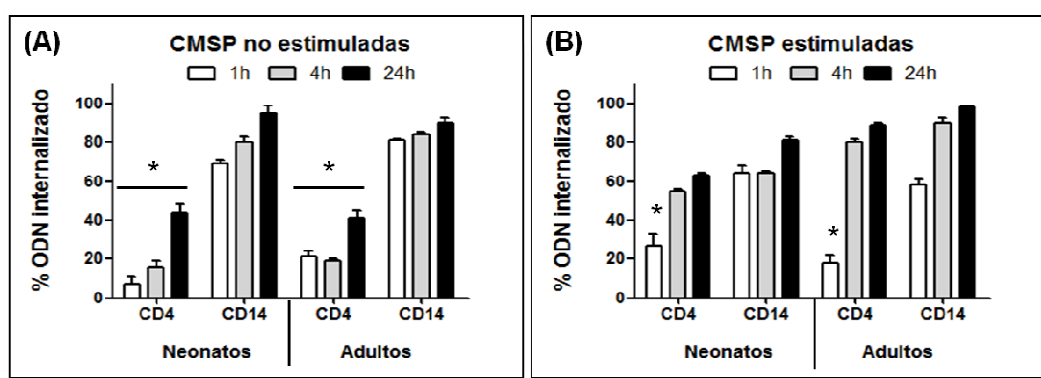


Fig. 59 Estudio de la internalización del ODN en CMSP de neonatos y adultos por citometría de flujo. (A) Porcentaje de entrada de ODN TAR en linfocitos (CD4) y monocitos (CD14) no estimulados recuperados de las CMSP por marcaje inmunomagnético. **(B)** Porcentaje de entrada de ODN TAR en linfocitos (CD4) y monocitos (CD14) estimulados. Estimuladas 48 h en presencia de 2 µg/mL de PHA y 50 UI/mL de IL-2. [ODN] = 1 µM. Los resultados se expresan como la media ± SD de 3 donantes. *: $p < 0.05$ vs control.

Posteriormente se estudió la entrada de los ODN en linfocitos y monocitos por microscopía confocal. Se obtuvieron los patrones de distribución intracelular dependiendo de la población estudiada (Fig. 60).

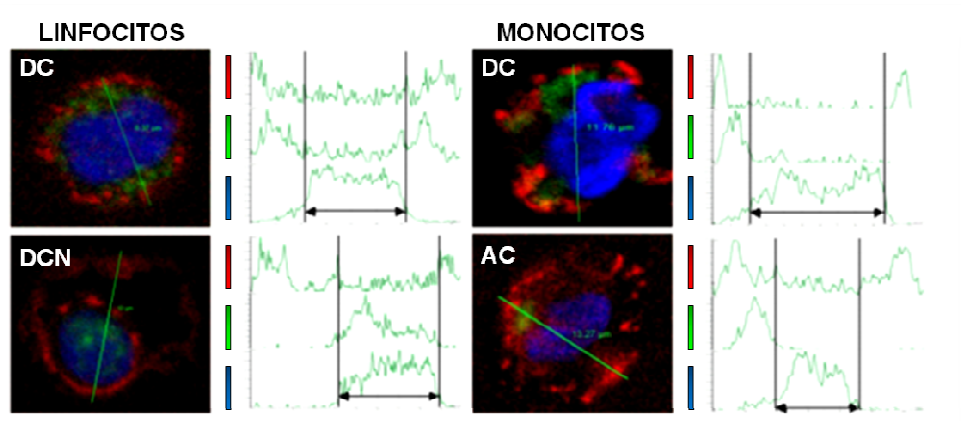


Fig. 60 Patrones de distribución intracelular del ODN TAR en CMSP. Se muestra una célula de cada patrón representativa de las encontradas en linfocitos T CD4+ y monocitos de neonatos y adultos, seguida de un análisis lineal de la intensidad de fluorescencia. Linfocitos (DC): Patrón difuso y citoplasmático del ODN TAR. Linfocitos (DCN): Patrón difuso, citoplasmático y nuclear del ODN TAR. Monocitos (DC): Patrón difuso y citoplasmático del ODN TAR. Monocitos (AC): Patrón agregado y citoplasmático del ODN TAR. [TAR] = 1 μ M. Linfocitos y monocitos marcados en rojo con anti-CD45 Texas Red y anti-CD14-PE respectivamente. Núcleo marcado en azul con DAPI. 24 h post-tratamiento.

El patrón citoplasmático y difuso se encontró tras 24 h de tratamiento en aproximadamente el 65 % de los linfocitos, independientemente de si procedían de adultos o neonatos. Este patrón también se observó en los monocitos y se encontró alrededor de un 40 % de células que presentaron un patrón de agregados citoplasmáticos muy característico, de aproximadamente 2 μ m de longitud (Fig. 60. Monocitos-AC). Los monocitos no presentaron una distribución nuclear del ODN en ninguna de las condiciones estudiadas.

4.8.3. Internalización del dendriplex en linfocitos, monocitos y células dendríticas

Todos los dendriplexes estudiados mostraron un patrón similar al del ODN fluoresceinado sin DEC+, es decir, difuso, nuclear y citoplasmático en más de un 50 % de linfocitos T CD4+ (Fig. 61).

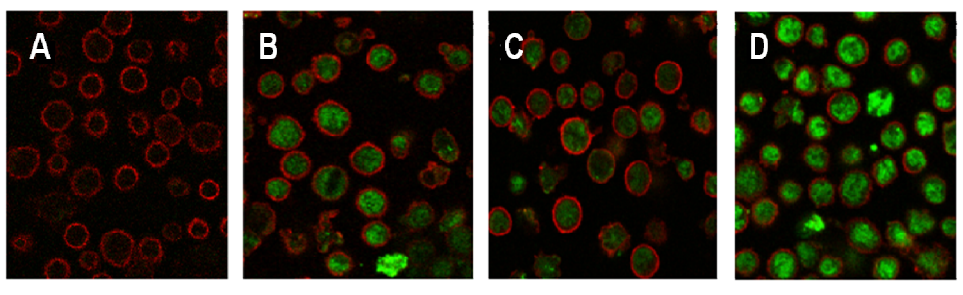


Fig. 61 Internalización del ODN PPT solo y formando dendriplex en linfocitos T CD4+. (A) Control de células no tratadas. (B) PPT. (C) Dendriplex N8/PPT. (D) Dendriplex NN8/PPT. 24h post-tratamiento. Membrana marcada con anti-CD45-Texas Red (rojo). Se cuantificó las unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) medidas con el programa del microscopio confocal.

Se observó un patrón similar con los cuatro DEC+ estudiados pero en algunos experimentos, los dendriplexes DEC+ NN8/ODN PPT y DEC+ NN16/ODN PPT consiguieron resultados superiores de ODN internalizado en comparación con el ODN solo (más cantidad de ODN por célula), aunque sin significación estadística (Fig. 61D).

Para mostrar que efectivamente se trataba de un patrón de fluorescencia citoplasmático y nuclear, se realizaron histogramas de una sola célula en un plano medio en XY para mostrar un patrón de fluorescencia citoplasmático y nuclear. Se muestra un ejemplo representativo de un análisis realizado sobre un linfocito T CD4+ tras 24 h de tratamiento con el dendriplex DEC+ NN8/ODN PPT. Se obtuvo el mismo patrón con el DEC+ NN16 (Fig. 62).

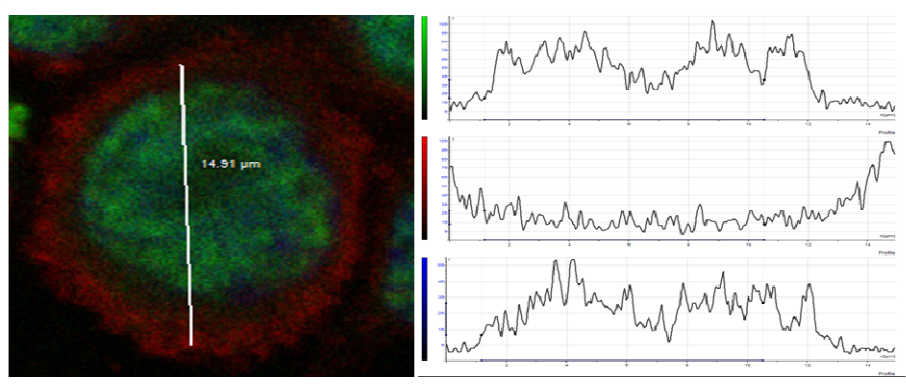


Fig. 62 Representación de un linfocito T CD4+ tratado con el dendriplex DEC+ NN8/ODN PPT. Línea en un corte en el plano medio XY y representación en histogramas de las emisiones de fluorescencia a lo largo de la misma. 24 h post-tratamiento. Verde (PPT), rojo (membrana, anti-CD45-Texas Red) y azul (núcleo, DAPI).

El patrón de entrada en agregados que se observó en el tratamiento de monocitos CD14+ con el ODN (Fig. 60) se repitió en los ensayos de entrada con el dendriplex DEC+ N8/ODN PPT (Fig. 63).

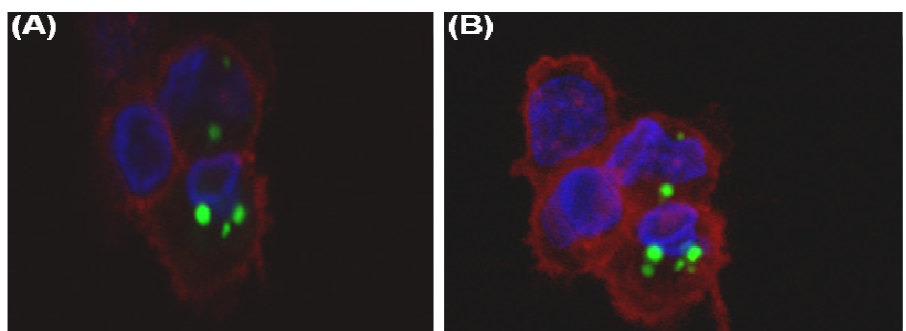


Fig. 63 Monocitos CD14+ transfectedos con dendriplex DEC+ N8/ ODN PPT. (A) Corte en el plano medio XY. **(B)** Proyección de cortes en Z del mismo campo. 24 h post-tratamiento. Verde (PPT), rojo (membrana, anti-CD14-PE) y azul (núcleo, DAPI).

También se estudió la entrada del ODN GEM91 y del dendriplex DEC+ NN16/ODN GEM91 en CDi y CDm y se observó una eficacia alta de transfección en ambos cultivos tras 2 h de tratamiento con el dendriplex DEC+ NN16/ODN SREV. Sin embargo, el ODN SREV se internalizó en poca cantidad, confirmando la ventaja del dendriplex DEC+/ODN para mejorar la entrada de material nucleico en CD (Fig. 64).

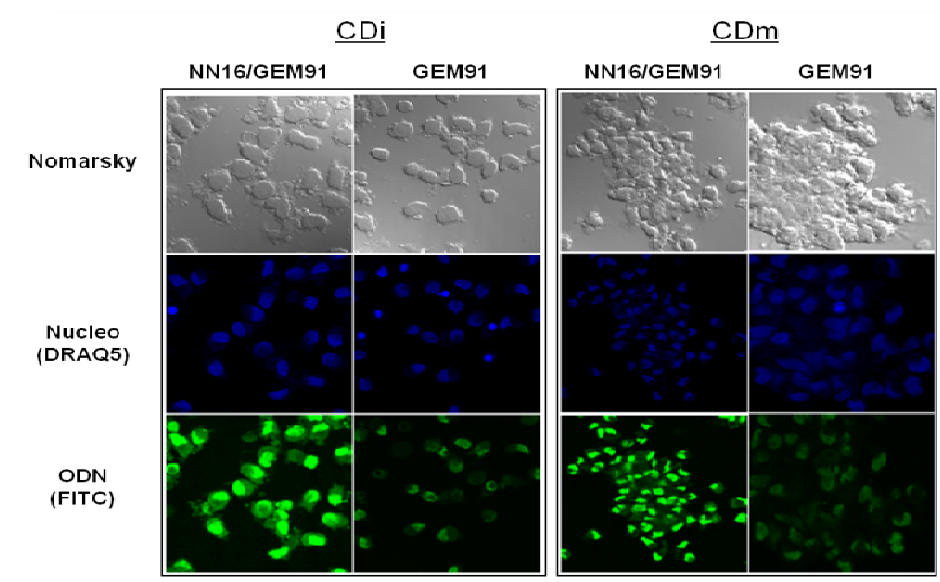


Fig. 64 Células dendríticas inmaduras y maduras transfectedas con DEC+ NN16/ODN GEM91. (CDi) Células dendríticas inmaduras tratadas con dendriplex DEC+ NN16/ODN GEM91 y ODN GEM91. **(CDm)** Células dendríticas maduras tratadas con dendriplex DEC+ NN16/ODN GEM91 y ODN GEM91. 2 h post-tratamiento.

Los resultados obtenidos tras el estudio de internalización de los dendriplexes confirmaron que la presencia de los DEC+ no interfería con la distribución natural de los ODN en el interior celular.

4.9. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL VIH

Debido a la capacidad de transfección mostrada por el DEC+ NN16, se estudió si los diferentes dendriplexes formados con los ODN antisentido TAR, GEM y SREV inhibían la replicación del VIH en cultivos primarios o líneas celulares T. El ratio empleado en los ensayos de inhibición fue 2/1 (NN16/ODN).

4.9.1 Estudio del efecto de dendriplexes en MT-2 infectadas por VIH

Se infectaron las células MT-2 con VIH-1_{NL4-3} a 0.05 *MOI* (apartado 3.9.3.) y se trataron con los dendriplexes DEC+ NN16/ODN, los ODN o el DEC+NN16 durante 24 h (Fig. 65).

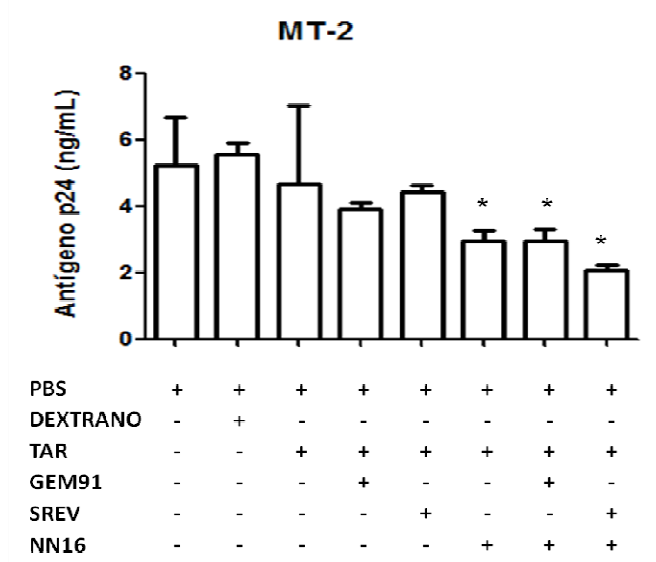


Fig. 65 Inhibición de la replicación del VIH en presencia del dendriplex NN16/ODN en MT-2. Efecto de los ODN antisentido solos y formando complejo con el DEC+ NN16 en MT-2 infectadas con VIH_{NL4.3}. Se cuantificó la producción de antígeno p24 en el medio de cultivo por ELISA a las 24h de tratamiento. [ODN] = 0,5 μ M; [NN16] = 1-2 μ M. Los resultados representan la media \pm SEM de dos experimentos independientes realizados por triplicado. **p* < 0.05 vs PBS.

La concentración de los ODN TAR, GEM91 y SREV a 0,5 μ M evidenció un efecto inhibitorio no específico, pero la presencia de los mismos ODN formando complejo con el DEC+ NN16 mostró un incremento significativo en la inhibición de la replicación del VIH (Fig. 65). La inhibición obtenida tras el tratamiento con el dendriplex DEC+ NN16/ODN TAR-SREV llegó a ser de un 60 % con respecto al control de células MT-2 tratadas con PBS.

La inhibición de la replicación del VIH producida por los dendriplexes se confirmó al evaluar en paralelo a 1 h y 24 h la toxicidad por un ensayo de liberación de LDH donde los dendriplexes no resultaron tóxicos en el sobrenadante del cultivo (Fig. 66). El efecto inhibitor de la replicación viral observado en la figura 65 fue debido al mecanismo del ODN antisentido

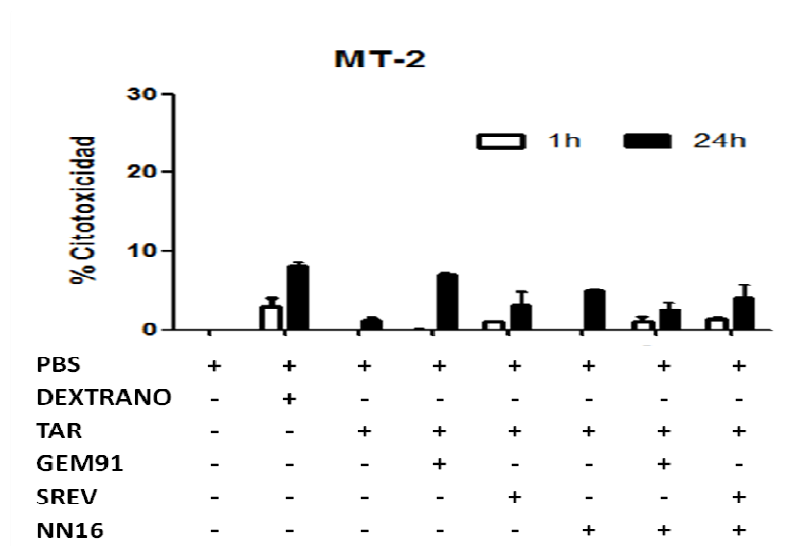


Fig. 66 Citotoxicidad del dendriplex NN16/ODN en MT-2. Ensayo de liberación de LDH en el sobrenadante de las MT-2 infectadas con VIH_{NL4.3} y tratadas con los dendriplexes DEC+ NN16/ ODN TAR, GEM91 o SREV recogido a 1h y 24h tras el tratamiento. [ODN] = 0,5 μ M; [NN16] = 1-2 μ M. Los resultados representan la media \pm SEM de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

4.9.2 Estudio del efecto de los dendriplexes en CMSP infectadas por VIH

Un estudio similar al realizado con la línea celular MT-2 se llevó a cabo en cultivo de CMSP estimuladas con PHA (apartado 3.9.3.). En este estudio también se evaluó la capacidad del dendriplex, DEC+ NN16 *per se* de inhibir la replicación del VIH (Fig. 67).

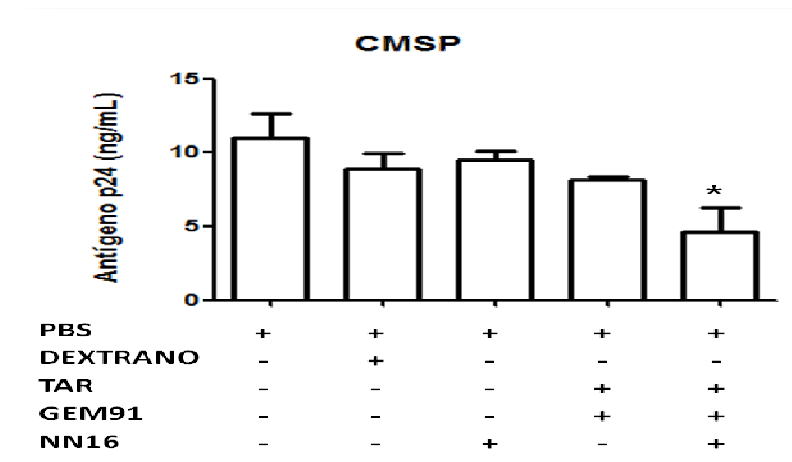


Fig. 67 Inhibición de la replicación viral en presencia del dendriplex NN16/ODN en CMSP. Efecto de los ODN antisentido TAR y GEM91 y formando complejo con el DEC+ NN16 en CMSP infectadas con VIH_{NL4.3}. Se cuantificó la cantidad de antígeno p24 en el sobrenadante del cultivo por ELISA a las 24 h de tratamiento. [ODN] = 0,5 μ M; [NN16] = 1-2 μ M. Los resultados representan la media \pm SEM de dos experimentos independientes realizados por triplicado. *: $p < 0.05$ vs PBS.

Se obtuvo un 60 % de inhibición de la replicación viral tras el tratamiento de las CMSP infectadas con VIH_{NL4.3} con el dendriplex DEC+ NN16/ODN TAR-GEM91 (Fig. 67). El DEC+ NN16 mostró un comportamiento similar a la molécula de dextrano. Estos resultados son consistentes con el efecto protector de los DEC+ sobre el ODN en su unión a las proteínas del suero y por lo tanto la obtención de un mejor efecto biológico. Se comprobó al igual que en la línea celular MT-2, que los dendriplexes utilizados no eran tóxicos tras un ensayo de liberación de LDH, incluso a 24 h (Fig. 68).

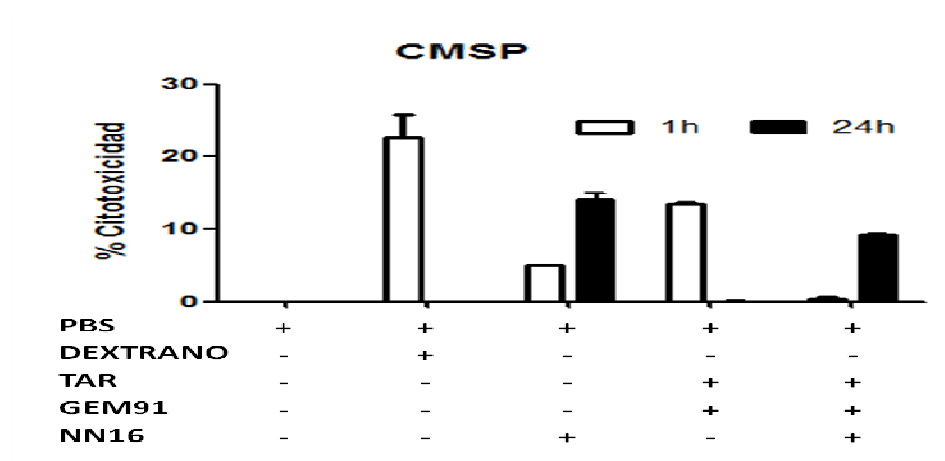


Fig. 68 Citotoxicidad del dendriplex NN16/ODN en CMSP. Ensayo de liberación de LDH en el sobrenadante de cultivo de las CMSP infectadas con VIH_{NL4.3} recogido a 1 h y 24 h post-tratamiento. [ODN] = 0,5 μ M; [NN16] = 1-2 μ M. Los resultados representan la media \pm SEM de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

4.10. BIODISTRIBUCIÓN DE DENDRIPLEXES

El estudio de la biodistribución del material nucleico transfectado en un modelo *in vivo* es un objetivo prioritario en terapia génica antisentido. El conocimiento de la distribución y acumulación del dendriplex en los primeros minutos tras una inyección podría ayudar al pronóstico de su eficacia de acción, no solo para el tratamiento del VIH, sino para otras enfermedades infecciosas o degenerativas [196]. El objetivo de este estudio fue analizar la biodistribución del dendriplex en los órganos de ratones de la cepa BALB/c (H-2d) de 8 semanas de edad.

El dendriplex DEC+ NN16/ODN TAR a ratio 2/1 (apartado 3.11.) se administró vía intravenosa a dos concentraciones, un ratón a 43,5 μ M de DEC+ NN16 y un ratón a 14,5 μ M de DEC+ NN16. Los ratones BALB/c se sacrificaron 30 min tras la inyección y se analizaron los órganos extraídos por tomografía de fluorescencia molecular (FMT).

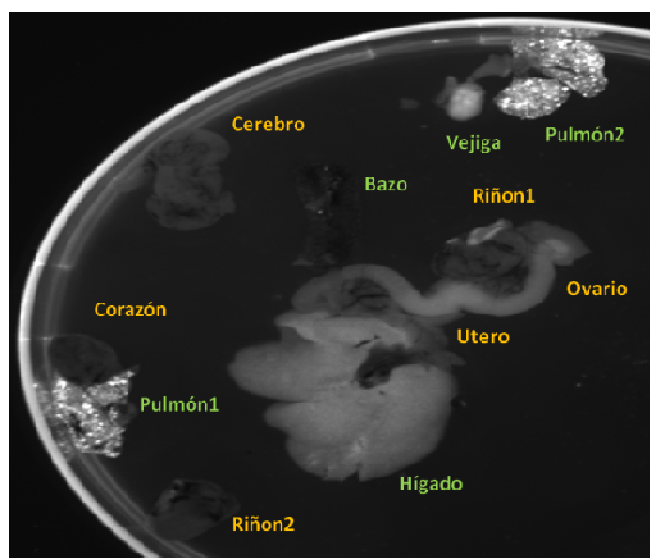


Fig. 69 Biodistribución del dendriplex NN16/TAR en los órganos del ratón. Los órganos extraídos del ratón tratado a la dosis alta de NN16 (43,5 μ M) durante 30 min se observaron en FMT (apartado 3.11.).

Se observó presencia del dendriplex DEC+ NN16/ODN TAR en los pulmones (puntos dispersos bien definidos), en el hígado (un punto intenso en una zona concreta), en el bazo (puntos dispersos poco intensos que fueron confirmados tras disgregación manual del órgano) e intensamente en la vejiga (Fig. 47). La intensidad de la señal fue dependiente de la concentración del dendriplex, por lo que el ratón tratado con la dosis alta de dendriplex se apreció mejor en el dispositivo de FMT.

II. DENDRÍMEROS DE ESTRUCTURA CARBOSILANO ANIÓNICOS

En esta segunda parte se exponen los resultados más relevantes obtenidos con los DEC- para su posible aplicación en terapia anti-VIH.

4.11. VIABILIDAD CELULAR DE LOS DENDRÍMEROS ANIÓNICOS

Se estudió la biocompatibilidad y eficacia de las tres generaciones de los tres tipos de DEC- con núcleo de silicio y terminaciones carboxilato y sulfonato (1G-C8, 2G-C16, 3G-C32, 1G-S8, 2G-S16 y 3G-S32) y con núcleo polifenólico (1G-O3S12, 2G-O3S24 y 3G-O3S48). Los primeros ensayos de citotoxicidad se realizaron por incorporación de azul tripán en la línea celular HEC-1A, una línea epitelial de endometrio utilizada en ensayos *in vitro* debido a que forman una monocapa con uniones intercelulares estrechas o *tight junctions* muy representativa del epitelio endometrial. Esta monocapa de HEC-1A se utilizó como modelo de primera barrera de protección frente a la infección por el VIH en el proceso de transmisión viral.

En primer lugar se estudió el efecto tóxico del grupo funcional periférico en el cultivo de HEC-1A y se observó la morfología al microscopio óptico de las tres generaciones de los DEC- 1G-C8, 2G-C16, 3G-C32, 1G-S8, 2G-S16 y 3G-S32. Para ello se realizó una curva dosis/respuesta a distintas concentraciones de los DEC- en la línea celular HEC-1A y tras 24 h de tratamiento se cuantificó el número de células viables al microscopio óptico (Fig. 70).

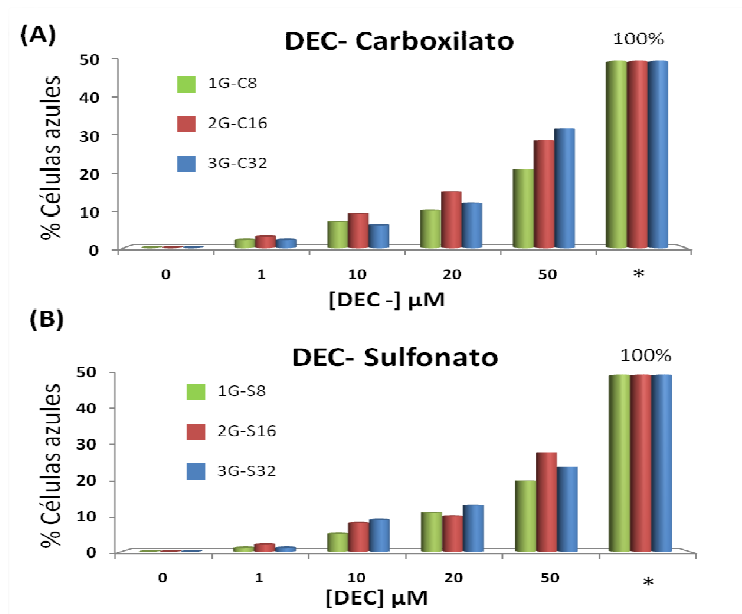


Fig. 70 Ensayo de incorporación de azul tripán en la línea celular HEC-1A. Las células HEC-1A se expusieron 24 h a las distintas concentraciones de DEC- y se cuantificó el número de células azules al microscopio óptico (aprox. 100 células por campo). *Tritón x-100 al 0.2 %.

No se observaron señales de agrupamiento celular ni cambio en la morfología en ninguna de las concentraciones estudiadas, excepto para la concentración de 50 μM con el DEC- con terminación carboxilato 3G-C32. Los DEC- fueron biocompatibles hasta 20 μM (Fig. 70).

Se estudió la citotoxicidad de los DEC- con núcleo polifenólico por un ensayo de liberación de LDH en la línea celular MT-2 y en CMSP. No se observó citotoxicidad en los cultivos celulares de MT-2 y CMSP tratados con los DEC- con núcleo polifenólico hasta una concentración de 50 μM (Fig. 71A). Sin embargo se observó una mayor toxicidad de estos DEC- en cultivo de CMSP a 20 μM y 50 μM (Fig. 71B) en comparación con el cultivo en MT-2 (Fig. 71A). Además, la tercera generación de estos DEC- con núcleo polifenólico presentó una citotoxicidad menor de lo esperado (Fig. 71A-B).

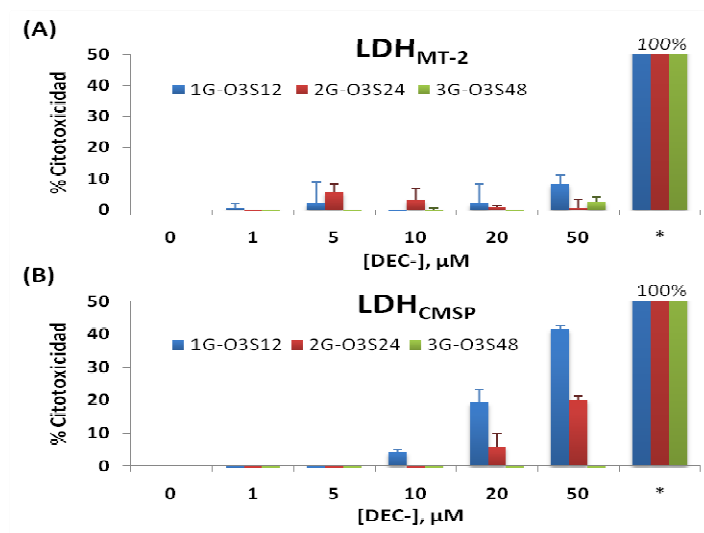


Fig. 71 Ensayo de liberación de LDH en MT-2 y CMSP tratadas con DEC- 1G-O3S12, 2G-O3S24 y 3G-O3S48. Se evaluó la toxicidad 1 h después del tratamiento con DEC- a concentraciones entre 1 μ M y 50 μ M en **(A)** MT-2 y en **(B)** CMSP. *Tritón x-100 al 0.2 %. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Se seleccionó la concentración de 10 μ M para evitar utilizar una concentración cercana al límite de toxicidad y se realizaron nuevos estudios de toxicidad. En la figura 72 se muestra la comparación de la biocompatibilidad de las tres generaciones de los DEC- con núcleo de silicio con otros reactivos aniónicos como el DxS y el suramin, que posteriormente se utilizarían como controles de inhibición de la transmisión del VIH.

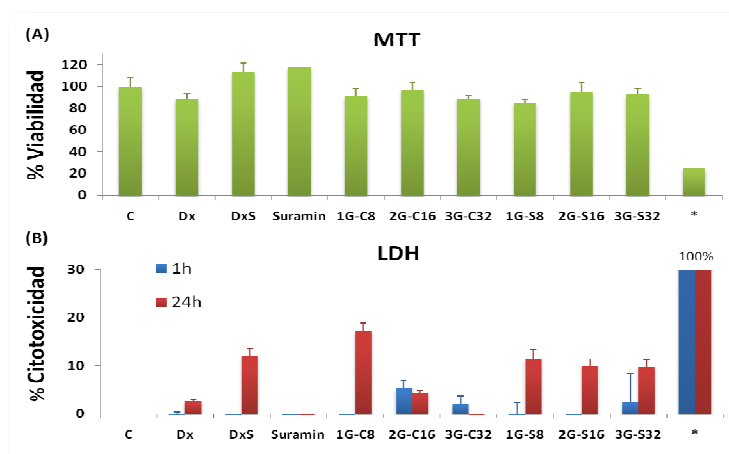


Fig. 72 Ensayos de viabilidad celular en las HEC-1A. Se evaluó la toxicidad de las tres generaciones de los DEC-carboxilatos y sulfonatos mediante **(A)** ensayo de MTT a las 24 h y **(B)** ensayo de liberación de LDH a 1 h y 24 h. Se utilizó una concentración de 10 μ M para todos los reactivos. C (PBS); Dx (Dextrano), DxS (Dextrano Sulfato) y Suramin. *(A) DMSO 20 %; (B) Tritón x-100 al 0.2 %. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Las tres generaciones de los dos tipos de DEC- con núcleo de silicio mostraron buenos niveles de biocompatibilidad en ambos ensayos. También el DxS y el suramin tuvieron buena biocompatibilidad a la dosis de 10 μM .

Se seleccionó la segunda generación de los tres tipos de DEC- con núcleo de silicio o núcleo polifenólico por haber presentado mejores resultados de solubilidad y toxicidad y se estudió su viabilidad en CMSP (Fig. 73). Se confirmó la adecuada biocompatibilidad de los DEC- a la concentración de 10 μM , independientemente del núcleo o el grupo funcional terminal.

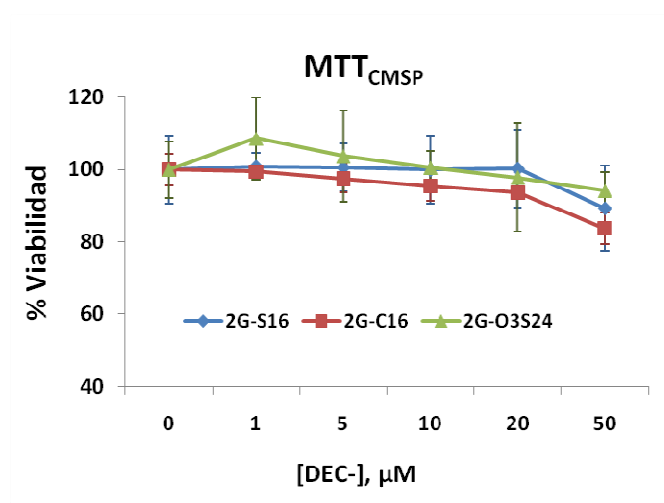


Fig. 73 Ensayo de MTT en CMSP de DEC- con núcleo de silicio o núcleo polifenólico de segunda generación. Se evaluó la toxicidad mediante un ensayo MTT 24 h después del tratamiento con los DEC-. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Se realizaron nuevos estudios de viabilidad celular con las segundas generaciones de los DEC- con núcleo de silicio en CMSP, eritrocitos, M Φ y CD y no se observó en ninguno de los cultivos celulares estudiados que los DEC- 2G-S16 y 2G-C16 fueron tóxicos a la concentración de 10 μM (Fig. 74A,B,C). También se estudió si estos DEC- incrementaban la proliferación de las CMSP y tampoco se observó un incremento de la proliferación de las CMSP a ninguna de las concentraciones estudiadas (Fig. 74D).

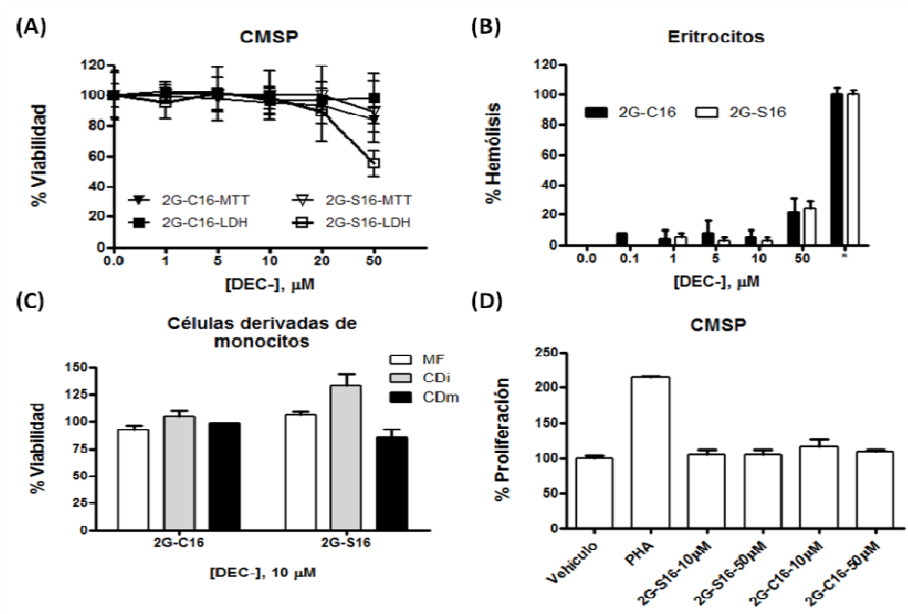


Fig. 74 Protocolo de biocompatibilidad de DEC-. (A) Ensayos de liberación de LDH y MTT en CMSP tras 24 h de tratamiento. (B) Liberación de hemoglobina en eritrocitos tratados 1 h. *Tritón x-100 al 0.2 %. (C) Ensayo de MTT en células derivadas de monocitos tras 24 h de tratamiento. (D) Ensayo linfoproliferativo analizado a los 4 días. PHA a 2 $\mu\text{g/mL}$. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

4.12. EFICACIA ANTI-VIH DE LOS DEC- 2G-C16 Y 2G-S16

Los DEC- 2G-S16 y 2G-C16 habían demostrado no ser tóxicos ni mitogénicos a la concentración de 10 μM . Para su posible uso como microbicida, se evaluó la capacidad de interaccionar con el VIH en el proceso de infección de las células epiteliales HEC-1A, además de estudiar la interacción directa DEC-/VIH. De producirse dicha interacción, la molécula de DEC- actuaría como una barrera física en la prevención de la transmisión del VIH a través de células endometriales y de su paso a la cavidad interna del útero.

4.12.1. Inhibición de la infección viral en células HEC-1A

La posibilidad de un uso preventivo frente a la infección por el VIH del DEC- 2G-S16 y el DEC- 2G-C16 planteó la cuestión de si los tiempos de tratamiento previos a la infección (pre-tratamiento) influirían en la eficacia anti-VIH, pensando en la aplicación de un gel microbicida de uso tópico minutos antes de la relación sexual. Por esta razón, se pre-trataron las células 2 h, 1 h y 0,5 h antes de infectarlas con el VIH-1_{NL4-3}.

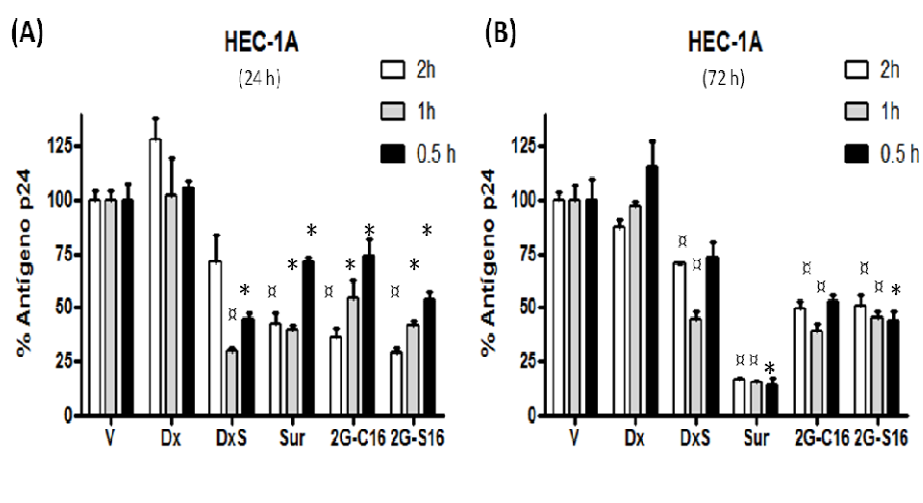


Fig. 75 Pre-tratamiento con los DEC- a distintos tiempos en las HEC-1A. (A) y (B) representan la cantidad de antígeno p24 cuantificado por ELISA en el sobrenadante de HEC-1A recogido a las 24 h y 72 h, respectivamente. Las HEC-1A fueron pre-tratadas con DEC- 2G-C16 y DEC- 2G-S16 a una concentración de $10\mu\text{M}$ 2 h, 1 h y 30 min antes de la infección por VIH_{NL4.3}. La infección se realizó con $200\text{ng VIH}_{\text{NL4.3}}/10^6$ HEC-1A durante 3 h. V (Vehículo: PBS); Dx (Dextrano), DxS (Dextrano Sulfato) y Sur (Suramin) se utilizaron a $10\mu\text{M}$. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs vehículo (PBS en todos los experimentos).

Las figuras 75A y B mostraron los valores de antígeno p24 en el sobrenadante de las HEC-1A tras 24 h y 72 h de la infección por VIH-1_{NL4-3}. Las HEC-1A se pre-trataron 2 h, 1 h y 0,5 h antes de la infección por VIH-1_{NL4-3} con los DEC- 2G-S16 y 2G-C16 y la molécula de Dx, DxS y suramin. Los resultados se representaron frente a las células HEC-1A tratadas sólo con el vehículo utilizado. En la figura 75A se observó un mayor efecto anti-VIH al utilizar un pre-tratamiento más prolongado. El pre-tratamiento de 2 h con DEC- 2G-S16 y 2G-C16 fue alrededor de un 30 % más eficaz que el pre-tratamiento de 30 min. Las moléculas de DxS y suramin a la misma concentración tuvieron el mismo efecto en del tiempo de pre-tratamiento. En cambio, la molécula de Dx no mostró ningún efecto antiviral. En la figura 75B se observa como a las 72 h se igualó la cantidad de antígeno p24 medido en el sobrenadante de las HEC-1A tratadas con los DEC- 2G-S16 y 2G-C16. Se seleccionó el pre-tratamiento de 1 h con los DEC- para los siguientes experimentos.

4.12.2. Inhibición de la internalización viral en células HEC-1^a

Las células HEC-1A se pre-trataron 1 h con los DEC- 2G-S16 y 2G-C16 y se expusieron al VIH-1_{NL4-3} durante 3 h. Tras este tiempo, las células lavadas se lisaron para cuantificar las partículas virales en el interior celular (Fig. 76).

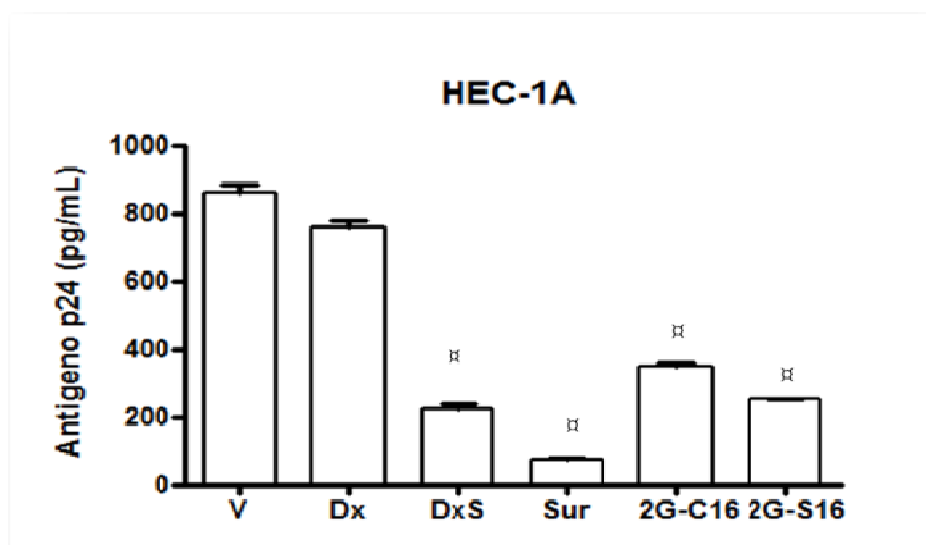


Fig. 76 Internalización del VIH en HEC-1A. Cantidad de antígeno p24 en el interior celular tras 3 h en contacto con el VIH_{NL4.3} a 200ng/10⁶ células. Las HEC-1A fueron pre-tratadas con 2G-C16; 2G-S16; Dx (Dextrano), DxS (Dextrano Sulfato) y Sur (Suramin) a 10 μ M 1 h antes de la infección. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *p < 0.01 vs vehículo.

Se observó que tras 3 h de infección por el VIH-1_{NL4-3}, la cantidad de virus detectada por cuantificación de antígeno p24 fue un 55 % y un 70 % menor en las células pre-tratadas con los DEC- 2G-C16 y 2G-S16, respectivamente frente a las tratadas con el vehículo. Los controles de moléculas aniónicas, DxS y suramin, impidieron la internalización viral en un 75 % y un 90 %, respectivamente. Estos datos están en concordancia con los resultados anteriores de inhibición de la infección y refuerza la teoría de que el dendrímero polianiónico ejerce de barrera sobre las células HEC-1A ante la presencia del VIH.

4.12.3. Inhibición de la infección viral en CMSP

Se realizó un ensayo de inhibición de la infección por el VIH en un cultivo primario de CMSP previamente activadas (Fig. 77).

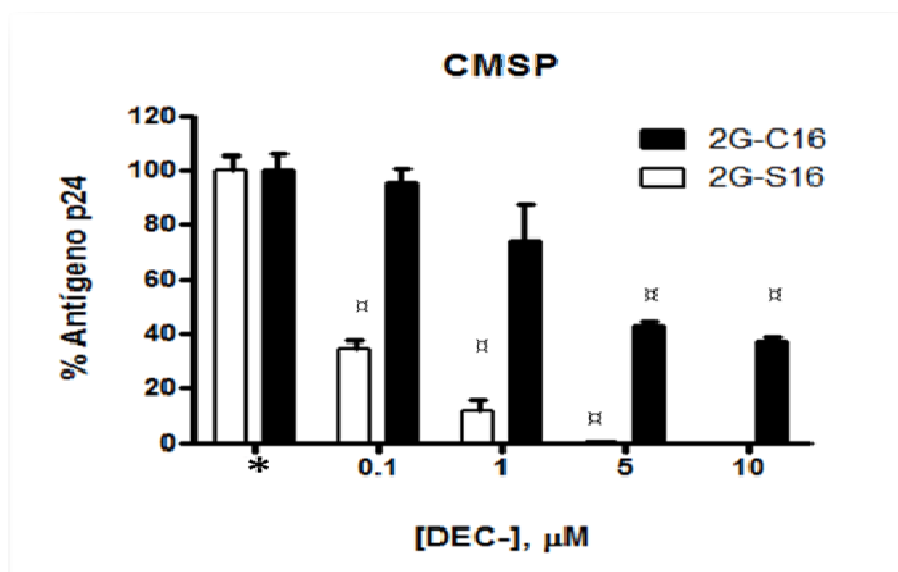


Fig. 77 Inhibición de la infección por el VIH en CMSP. Las CMSP fueron pre-tratadas con 2G-C16 y 2G-S16 a 0,1; 1; 5 y 10 μM 1 h antes de la infección por el VIH_{NLA.3} a 50 ng/10⁶ células durante 3 h. El sobrenadante se recogió a los 6 días y se cuantificó la producción de antígeno p24 por ELISA. *Células tratadas con el vehículo (PBS). Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. $^{**}p < 0.01$ vs vehículo.

Tras el pre-tratamiento de 1 h antes de la infección de CMSP activadas con concentraciones desde 0,1 μM a 10 μM de DEC- 2G-C16 y 2G-S16 se observó una disminución significativa en la producción de antígeno p24 a los 6 días de cultivo. El DEC- 2G-S16 produjo una disminución de antígeno p24 significativa a la dosis más baja (0,1 μM) y no se detectaron valores de antígeno p24 a la dosis más alta (10 μM) (Fig. 77). El DEC- 2G-C16 produjo una inhibición en la producción de antígeno p24 de un 60 % a las concentraciones de 5 μM y 10 μM (Fig. 77).

4.13. ACTIVIDAD PROFILÁCTICA Y TERAPÉUTICA DEL DEC- 2G-S16

El DEC- 2G-S16 tuvo una mejor acción contra partículas virales en el pre-tratamiento de células HEC-1A que el DEC- 2G-C16 (apartado 4.12.), por lo que se estudió si el DEC- 2G-S16 producía una inhibición de la replicación viral en CMSP. Con este objetivo las CMSP activadas se pre-trataron con DEC- 2G-S16 (10 μ M) 24 h y 1 h antes de la infección con VIH_{NL4.3} y se recogió el sobrenadante del cultivo a las 72 h (Fig. 78A). Además, se llevo a cabo otro experimento en el que primero se infectaron las CMSP previamente activadas, se trataron con DEC- 2G-S16 (10 μ M) 1 h y 24 h después de la infección con VIH_{NL4.3} y se recogió el sobrenadante del cultivo a las 72 h (Fig. 78B).

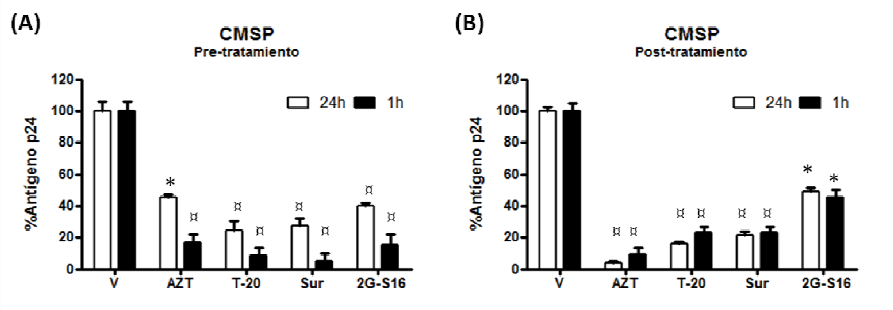


Fig. 78 Pre y post-tratamiento de CMSP con DEC- 2G-S16. (A) Las CMSP previamente activadas fueron pre-tratadas con 2G-S16 a 10 μ M 24 h y 1 h antes de la infección por el VIH_{NL4.3} a 50 ng/10⁶ células. (B) Las CMSP previamente activadas fueron post-tratadas con DEC- 2G-S16 a 10 μ M 1 h y 24 h después de la infección por VIH_{NL4.3}. El sobrenadante de los cultivos se recogió a las 72 h. AZT, T-20 y Suramin (Sur) se utilizaron a 10 μ M. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes por triplicado. * p < 0.05; \square p < 0.01 vs vehículo.

Se observó una mayor inhibición de la replicación viral (80 %) tras 1 h de pre-tratamiento con el DEC- 2G-S16 que a 24 h de pre-tratamiento, donde se observó un 60 % de inhibición, siendo en ambos casos significativa. Como era de esperar, con el AZT, T-20 y suramin se obtuvieron resultados similares, inhibiendo en más de un 60 % la infección viral (Fig. 78A). Cuando las CMSP fueron primero infectadas y posteriormente se trataron con el DEC- 2G-S16 también se observó una inhibición significativa de un 50 % de la replicación viral, independientemente del tratamiento tras 1 h y 24 h de la infección por VIH (Fig. 78B). En este caso se observó una inhibición de la replicación viral de más del 90 % con AZT y mayor del 80 % cuando se trataron con T-20 o Suramin. Estos datos indican que el DEC- 2G-S16 interviene no sólo en el proceso de entrada/infección, sino también en el ciclo de replicación viral (Fig. 78B).

4.14. INACTIVACIÓN DEL VIH Y VIS POR EL DEC- 2G-S16

Una vez comprobada la eficacia de DEC- 2G-S16 en bloquear la infección e internalización de las partículas virales, se procedió a estudiar si se producía una inactivación de distintos aislados virales, VIH-1_{NL4-3}, VIH-1_{BaL} y VIH-2_{CBL23} y VIS_{mac239} en presencia del DEC- 2G-S16. Se expusieron las partículas virales de VIH y VIS a la presencia del DEC- 2G-S16 durante 1 h, se lavó para retirar el DEC- 2G-S16 en suspensión y se analizó la capacidad infectiva de las partículas de virus tratadas en cultivos de CMSP activadas o de M8166.

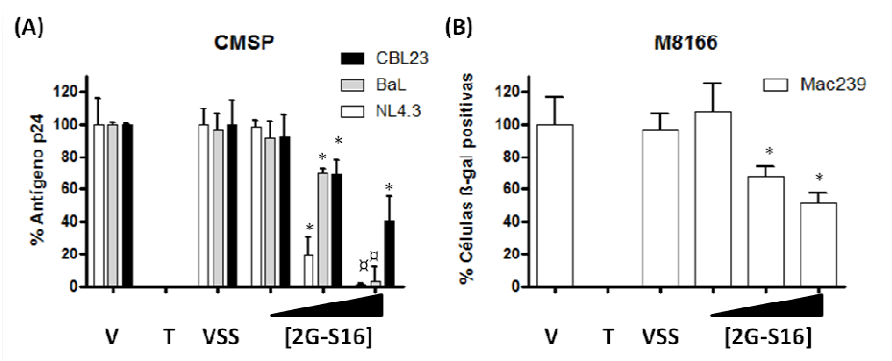


Fig. 79 Inactivación viral por el DEC- 2G-S16. (A) Los aislados virales VIH-1_{NL4-3}, VIH-1_{BaL} y VIH-2_{CBL23} adheridos en el fondo de las placas se trataron 1 h con concentraciones crecientes del DEC- 2G-S16 (0,1; 1 y 10 μM). Las CMSP previamente activadas se añadieron a cada placa tratada y tras cuatro días de cultivo se cuantificó la cantidad de antígeno p24 por ELISA. (B) El aislado viral VIS_{mac239} se procesó como en (A) y se añadieron las M8166. A los cuatro días se recogió sobrenadante y se cuantificaron las partículas virales mediante el ensayo de actividad β-galactosidasa en células P4-R5 MAGI. V (Vehículo: PBS); T (Tritón-x100 al 1 %); VSS (Vinil sulfonato de sodio a 10 μM). Los datos representan la media ± SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **p* < 0.05; ***p* < 0.01 vs vehículo.

Los resultados de cuantificación de antígeno p24 en el sobrenadante de las CMSP tratadas con DEC- 2G-S16 a 10 μM tras 4 días de cultivo muestran una reducción significativa de VIH-1_{NL4-3} y VIH-1_{BaL} próxima al 100 %. En el ensayo con VIH-2_{CBL23} la reducción fue del 60 %, siendo también significativa (Fig. 79A). La concentración de 0,1 μM del DEC- 2G-S16 no mostró inactivación viral de ninguno de los aislados virales utilizados, al igual que el grupo aniónico sulfonato sin la estructura carbosilano (VSS) a la concentración de 10 μM (Fig. 79A). En la figura 79B se observa el efecto del DEC- 2G-S16 a 10 μM en VIS_{mac239}, con un 50 % menos de células M8166 infectadas. De esta forma se mostró la capacidad de inactivación viral del DEC- 2G-S16.

4.15. INHIBICIÓN DE LA TRANSMISIÓN VIRAL POR EL DEC- 2G-S16

Una vez demostrada la actividad antiviral del compuesto DEC- 2G-S16 y puesto que la mucosa vaginal sana no actúa como una barrera eficaz contra la infección por el VIH, se diseñaron diferentes experimentos para estudiar su posible uso como microbicida vaginal. La piel del interior de la vagina es vulnerable a la invasión del VIH a través del epitelio escamoso del aparato genital [197]. Por esta razón, se estudió la capacidad del DEC- 2G-S16 de impedir el paso de las partículas virales a través del epitelio vaginal e inhibir la infección por el VIH de las células T CD4+, MΦ y CD, en el caso de que el virus atravesara la barrera epitelial.

4.15.1. Interacción del DEC- 2G-S16 y el VIH en células vaginales

Se utilizaron células del epitelio vaginal (VK2/E6E7) y células del endometrio (HEC-1A), con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración del DEC- 2G-S16 a lo largo del tiempo tras una única aplicación pre-infección por el VIH-1_{NL4-3} (Fig. 80).

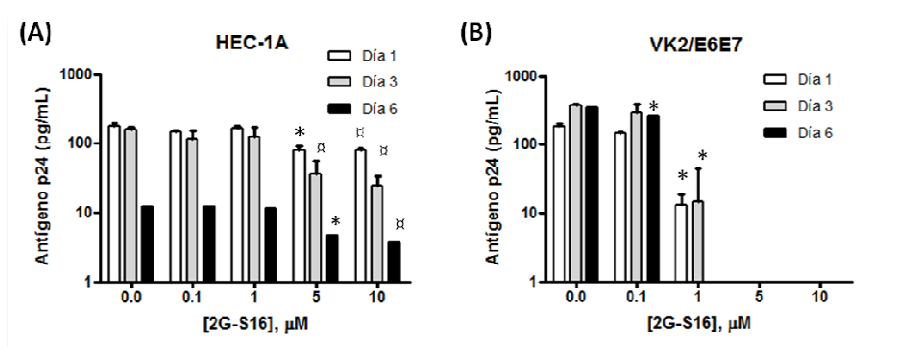


Fig. 80 Interacción del DEC- 2G-S16/VIH en células vaginales. (A) HEC-1A y (B) VK2/E6E7 fueron pre-tratadas con DEC- 2G-S16 a diferentes concentraciones 1 h antes de la infección por el VIH_{NL4.3}. El sobrenadante del cultivo se recogió a día 1, 3 y 6. Los datos representan la media ± SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado. **p* < 0.05; ***p* < 0.01 vs vehículo.

Se observó un efecto inhibitorio significativo de la infección por el VIH-1_{NL4-3} en las células epiteliales vaginales a partir de la concentración de 5 μM del DEC- 2G-S16 en HEC-1A y de 1 μM en VK2/E6E7. No se detectó antígeno p24 en el sobrenadante de VK2/E6E7 pre-tratadas con DEC- 2G-S16 a la concentración de 5 y 10 μM. Además, las células no mostraron signos de toxicidad tras ser teñidas con azul tripán por lo que la actividad del DEC- 2G-S16 en las células epiteliales vaginales fue más eficaz que en las células de endometrio.

4.15.2. Transmisión viral a través de una monocapa de HEC-1A

4.15.2.1. Formación de la monocapa

La polarización de las células epiteliales se realizó utilizando soportes permeables *transwell* y se caracterizó la monocapa de las células HEC-1A mediante espectrofluorimetría y observación óptica (apartado 3.9.1.). En la figura 81 se describen los ensayos e imágenes más representativas del estudio.

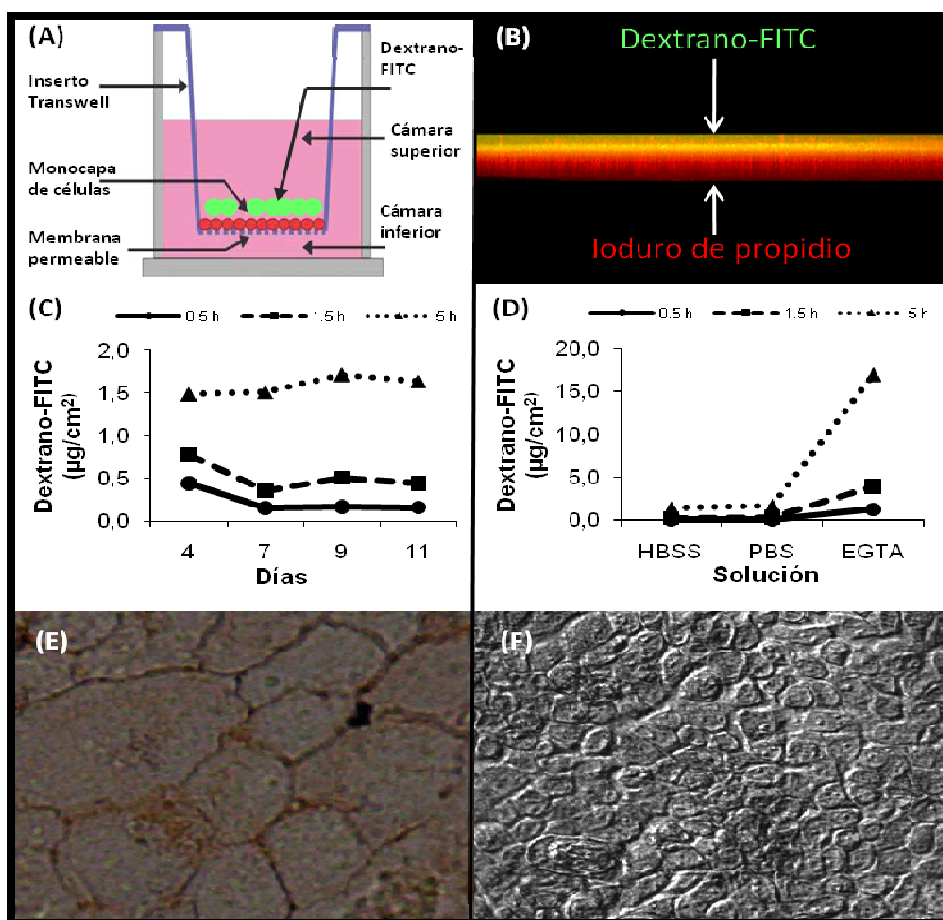


Fig. 81 Monocapa de HEC-1A. (A) Dibujo representativo del dispositivo *transwell* con las moléculas de dextrano-FITC depositadas en la cámara superior. (B) Foto tomada con el microscopio confocal en el plano X de la monocapa 30 min después de la administración de 50 μg de dextrano-FITC en la cámara superior. Rojo: tinción del núcleo con ioduro de propidio. Amarillo: mezcla de Ioduro de Propidio y dextrano-FITC. (C) Fluorimetría del sobrenadante de la cámara inferior tras 0.5, 1.5 y 5 h de la adición de dextrano-FITC a la cámara superior del *transwell* con células HEC-1A. (D) Fluorimetría realizada como se describe en (A) analizada a día 7 en distintas soluciones (PBS, HBSS y EGTA). (E) Tinción de plata de las *tight junctions* a día 7. (F) Microscopía DIC a día 7. Los detalles de estos ensayos se detallan en el apartado 3.10.1.

A partir del día 7 la monocapa mostró unos valores de dextrano-FITC en la cámara inferior constantes, indicio indirecto de la formación de la monocapa (Fig. 81A). En la figura 81B se muestra el daño a las uniones intercelulares estrechas que produjo la solución de EGTA, incrementando el paso de dextrano-FITC a la cámara inferior. Se confirmó la formación de las uniones intercelulares estrechas o *tight junctions* y la confluencia de las células a los 7 días (Fig. 81C-D). En la figura 81E se muestra un esquema del dispositivo de *transwell* con la monocapa de HEC-1A formada a los 7 días y la administración de dextrano-FITC en la cámara superior. La imagen 81F muestra una imagen tomada mediante microscopía confocal a los 30 min de la administración de dextrano-FITC y se observó como colocó la señal en verde del dextrano-FITC con el marcaje en rojo de las células de la monocapa. Por tanto, para obtener una monocapa de células epiteliales polarizadas perfecta, las HEC-1A se deben cultivar durante 7 días antes del inicio de cualquier tratamiento.

El establecimiento *in vitro* de estas propiedades de barrera pueden ser estudiados monitorizando la *resistencia eléctrica transepitelial (TEER)* colocando para ello dos electrodos, uno fuera y otro dentro del inserto *transwell*. De esta forma, una reducción en el valor inicial de *TEER* indica una mala formación de la misma. Se utilizó HEC-1A y VK2/E6E7 para los experimentos de transmisión viral, aunque solo las HEC-1A mostraron unos valores de resistencia elevados (Fig. 82).

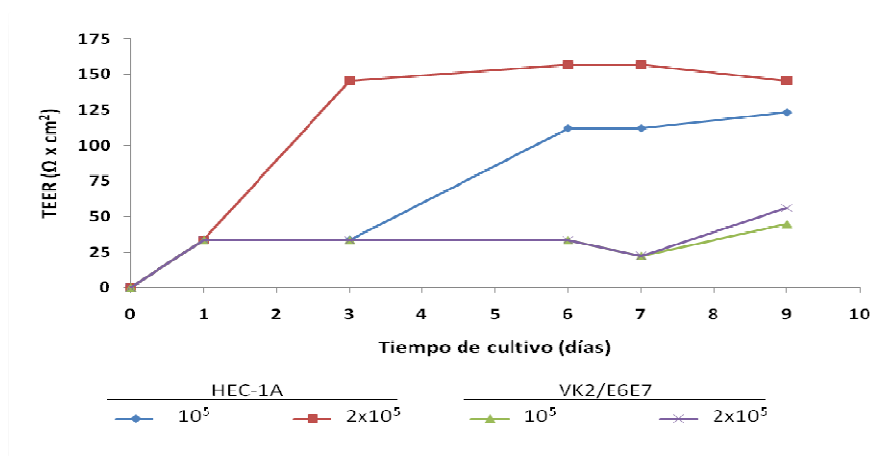


Fig. 82 Resistencia eléctrica transepitelial (TEER) medida a través de la monocapa de HEC-1A y VK2/E6E7 a distintos tiempos. 1x10⁵ y 2x10⁵ células de cada tipo celular se cultivaron en diferentes insertos de *transwell* y se midió TEER hasta 9 días después de iniciar el cultivo. Los valores representan un experimento por duplicado.

Independientemente del número de células iniciales que se cultivaron para la formación de la monocapa de células epiteliales, los valores de TEER recogidos a los 7 días fueron muy similares para cada tipo celular (Fig. 82). Los valores de *TEER* bajos para VK2/E6E7 confirmaron la escasa tendencia de este tipo celular a formar uniones intercelulares estrechas como estaba previamente descrito [198]. Los valores de HEC-1A se utilizaron como control de una adecuada formación de la monocapa y los valores iniciales de $150 \Omega \times \text{cm}^2$ a 7 días de cultivo se mantuvieron en todos los experimentos. Como ejemplo de la óptima viabilidad de la monocapa durante los ensayos, se muestra el porcentaje de variación de *TEER* en presencia del DEC- 2G-S16 y EGTA (Fig. 83).

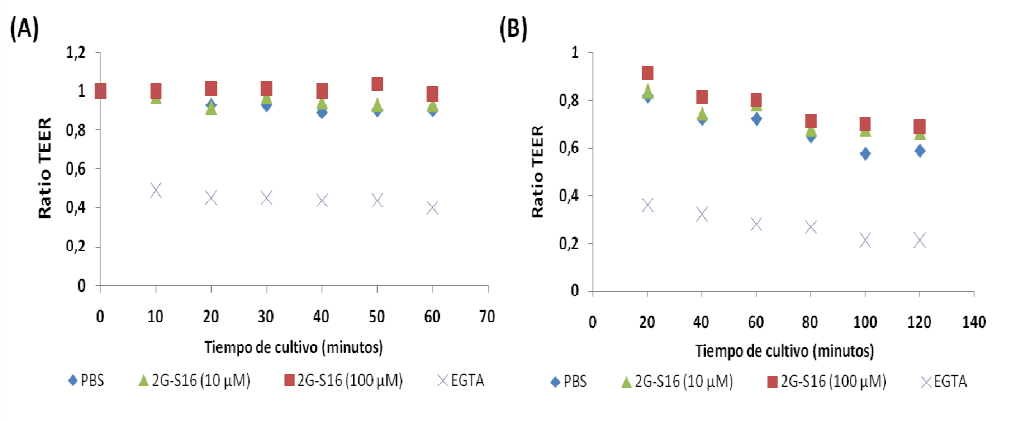


Fig. 83 Pre-tratamiento e infección de la monocapa de HEC-1A. Valores de resistencia eléctrica transepitelial (*TEER*). (A) La monocapa de HEC-1A en *transwell* a día 7 se pre-trató con el DEC- 2G-S16 a 10 μM y 100 μM , además del mismo volumen de PBS y EGTA a 1mM como controles. Se midieron los valores de *TEER* durante la hora de pre-tratamiento y se representó el ratio vs células no tratadas. (B) Se añadieron 100 ng de VIH_{NL4.3} en la cámara superior del inserto *transwell* y se midieron los valores de *TEER* durante 2 h. Los valores representan un experimento por duplicado.

Se observó que las concentraciones de DEC- 2G-S16 10 μM y 100 μM no afectaba a los valores de *TEER* de la monocapa de HEC-1A, con respecto al valor de los insertos *transwell* no tratados (Fig. 83A). Es decir, en el transcurso del pre-tratamiento de 1 h con el DEC- 2G-S16, la monocapa no sufrió ninguna alteración. En cambio, al añadir 1 mM de EGTA se observaron signos de rotura de las uniones intercelulares estrechas y el valor de la resistencia transepitelial disminuyó más de un 50 % en los primeros 10 min de tratamiento (Fig. 83A). Los valores de *TEER* disminuyeron en presencia del VIH a lo largo del tiempo pero con el DEC- 2G-S16 los valores fueron ligeramente superiores a los valores de las células tratadas solo con el virus, incluso a la

concentración de 100 μ M (Fig. 83B). Estos valores confirmaron la biocompatibilidad del DEC- 2G-S16 con la monocapa de células HEC-1A.

4.15.2.2. Inhibición de la transmisión viral

Se llevaron a cabo experimentos en monocapa de células endometriales para evaluar el paso de las partículas virales de tres aislados diferentes de la cámara superior (zona apical) del dispositivo *transwell* a la cámara inferior (zona basolateral) (Fig. 84).

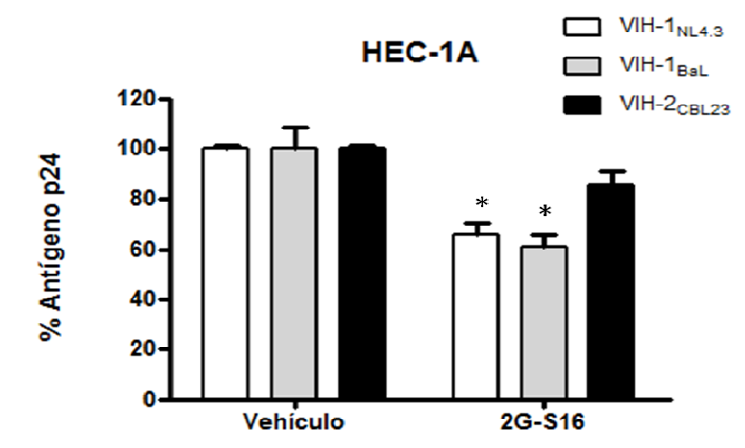


Fig. 84 Reducción de la transmisión viral a través de la monocapa de HEC-1A. Las células se pre-trataron con 2G-S16 a 10 μ M 1 h antes de dispensar el virus (VIH-1_{NL4-3}, VIH-1_{BaL} y VIH-2_{CBL23}) en la cámara superior del dispositivo. El sobrenadante basolateral se recogió a las 24 h. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.05$ vs vehículo.

El pre-tratamiento de la monocapa de HEC-1A con el DEC- 2G-S16 a 10 μ M redujo la presencia de partículas virales en el sobrenadante basolateral en más de un 30 % con los aislados virales VIH-1_{NL4-3} y VIH-1_{BaL} y de un 10 % en el asilado viral VIH-2_{CBL23} (Fig. 84), estando en concordancia con los resultados obtenidos en los experimentos de inactivación viral (Fig. 84).

El VIS no puede detectarse por cuantificación de antígeno p24, además de que esta técnica no muestra el número de partículas infectivas en el sobrenadante

analizado. Se cuantificaron las partículas infectivas de virus en el sobrenadante de la cámara inferior del dispositivo *transwell* por el ensayo de β -galactosidasa en células P4-R5 MAGI, con el objetivo de obtener diferencias más significativas tras el pre-tratamiento de las HEC-1A con el DEC- 2G-S16.

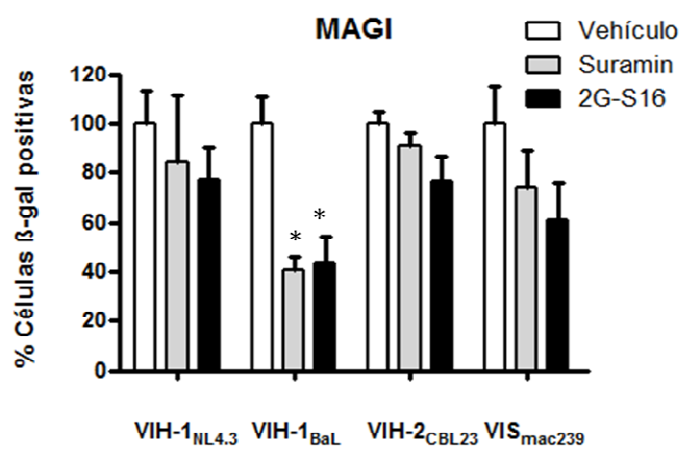


Fig. 85 Reducción de la infectividad viral. La monocapa de HEC-1A pre-tratada 1 h antes con DEC- 2G-S16 a 10 μ M se enfrentó a distintos aislados virales durante 24 h. Se realizó una cuantificación de las partículas virales infectivas que atravesaron la monocapa mediante el ensayo de β -galactosidasa en células P4-R5 MAGI. Los datos representan la media \pm SD de dos experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.05$ vs vehículo.

Con el VIH-1_{NL4-3}, VIH-2_{CBL23} y VIS_{mac239} se observó una reducción de partículas infectivas en torno al 20 % y con el VIH-1_{BaL} la reducción fue de más del 50 % siendo esta diferencia significativa (Fig. 85). En todos los casos, el DEC- 2G-S16 tuvo un efecto similar al obtenido con la molécula aniónica suramin a la misma concentración.

4.15.3. Interacción del DEC- 2G-S16 y el VIH en macrófagos y células dendríticas inmaduras

Las poblaciones celulares de M Φ y CDi localizadas bajo el epitelio vaginal junto con las CMSP constituyen las principales dianas infectivas del VIH, por lo que se diseñó un experimento para evaluar la capacidad del DEC- 2G-S16 para inhibir la infección por el VIH en M Φ y CDi.

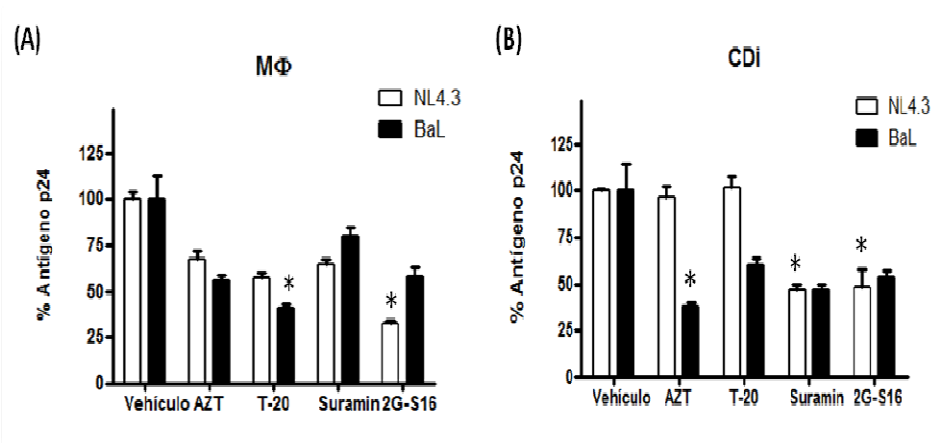


Fig. 86 Inhibición de la infección de células derivadas de monocito. (A) Los MΦ y (B) las CDi fueron tratadas con los antirretrovirales AZT y T-20 y con suramin y el DEC- 2G-S16 1 h antes de la infección por VIH-1_{NL4-3} y VIH-1_{BaL}. El sobrenadante de cultivo se recogió a las 72 h y se cuantificó la producción de antígeno p24 por ELISA. AZT, T-20, Suramin y 2G-S16 a 10 μM. Los datos representan la media ± SD de dos experimentos independientes por triplicado. *p< 0.05, **p< 0.01 vs vehículo. Los resultados se muestran en porcentajes para mejor visualización de los efectos con los aislados virales VIH-1_{NL4-3} y VIH-1_{BaL} en los dos tipos celulares estudiados.

En los MΦ se observó una reducción significativa en la producción de VIH-1_{NL4-3} al ser pre-tratados con DEC- 2G-S16 y de VIH-1_{BaL} al ser pre-tratados con T-20 (Fig. 86A). En CDi se observó una reducción significativa en la producción de VIH-1_{NL4-3} al ser pre-tratadas con el DEC- 2G-S16 o suramin y en la producción de VIH-1_{BaL} al ser pre-tratadas con AZT. El pre-tratamiento de MΦ y CDi con el DEC- 2G-S16 produjo una reducción significativa en la producción de VIH-1_{NL4-3} pero no de VIH-1_{BaL} (Fig. 86).

Posteriormente, se realizó un experimento complementario al anterior donde los MΦ y CDi se pre-trataron con DEC- 2G-S16 1 h antes de la infección con VIH-1_{NL4-3} y VIH-1_{BaL}. Esta infección se mantuvo durante 24 h y se recogió el sobrenadante del cultivo celular para cada punto. Las CMSP previamente activadas se trataron con dicho sobrenadante durante tres horas y se cuantificó la producción de antígeno p24 tras 72 h de cultivo.

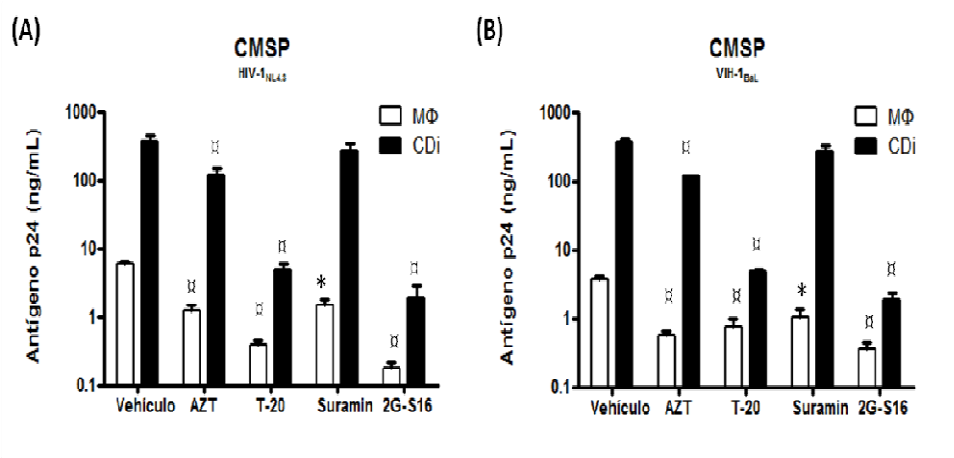


Fig. 87 Infección CMSP a partir de sobrenadante de células derivadas de monocito en presencia del DEC- 2G-S16. Las células derivadas de monocitos se pre-trataron 1 h antes de la infección por (A) VIH_{NL4.3} o (B) VIH_{BaL} con DEC- 2G-S16, AZT, T-20 y Suramin a 10 μ M. Se cultivaron 24 h y el sobrenadante de este cultivo se añadió a CMSP activadas. Se recogió sobrenadante a las 72 h y se cuantificó la producción de antígeno p24 por ELISA. Los datos representan la media \pm SD de dos experimentos independientes por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs vehículo.

Se observó una reducción significativa en la infección de CMSP a partir de los sobrenadantes de MΦ y CDi. Esta reducción en la producción viral es consecuencia del pre-tratamiento a 10 μ M con DEC- 2G-S16 de las poblaciones de MΦ y CDi previa infección por VIH-1_{NL4.3} y VIH-1_{BaL}. Los sobrenadantes procedentes de MΦ y CDi pre-tratados con los antirretrovirales AZT y T-20 también mostraron una reducción significativa de la infectividad por VIH-1_{NL4.3} y VIH-1_{BaL}. El suramin fue la única molécula que no tuvo ningún efecto en CDi infectadas por VIH-1_{BaL} (Fig. 87). Este experimento mostró una mayor sensibilidad para determinar el efecto anti-VIH de las moléculas estudiadas que en la figura 86 no producían una inhibición viral significativa.

4.16. ESTUDIO GENÉTICO DE LA INTERACCIÓN DEC- 2G-S16 Y CÉLULAS VAGINALES

La producción de citocinas o quimiocinas proinflamatorias en un modelo de epitelio vaginal daría lugar a la acumulación de poblaciones celulares susceptibles a la infección viral bajo esta primera barrera biológica. Se diseñó un experimento utilizando un chip de ADN (*DNA microarrays*) con el objetivo de evaluar la expresión de genes relacionados con inflamación en presencia de los DEC- 2G-S16 y 2G-C16. Se seleccionó una concentración de 5 μM y una exposición de 1 h de los DEC- 2G-S16 y 2G-C16 sobre la monocapa de HEC-1A.

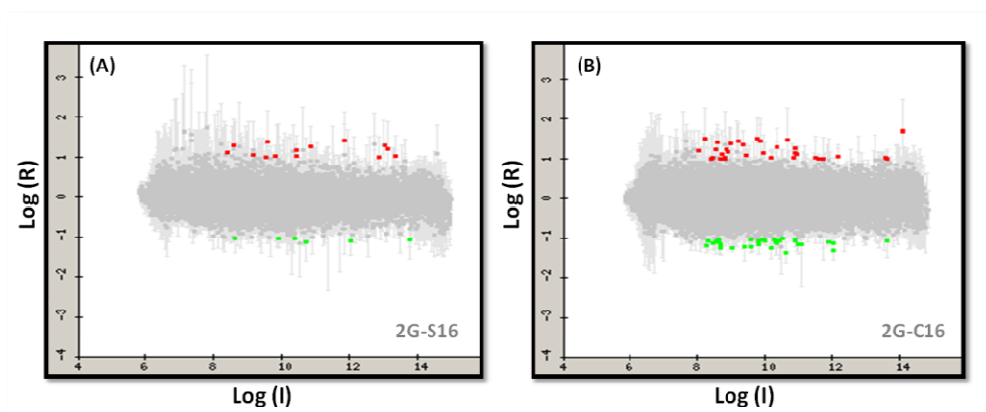


Fig. 88 Genes desregulados por los DEC- 2G-S16 y 2G-C16. (A) Representación de los 20 genes desregulados tras 1 h de contacto entre 2G-S16 y la monocapa de HEC-1A. (B) Representación de los 60 genes desregulados tras 1 h de contacto entre 2G-C16 y la monocapa de HEC-1A. Restricciones: $\log(R) > 1$ o < -1 , siendo $R = \text{Ratio}$; $\log(I) > 8$, siendo $I = (\text{intensidad Cy3} + \text{intensidad Cy5})/2$; p-valor (LiMMA) < 0.05 . Se destacan en rojo y verde los genes seleccionados como sobre-expresados o reprimidos por exposición a los DEC-, respectivamente.

En la figura 88 se muestran las gráficas obtenidas por el programa de análisis con las restricciones citadas en el pie de figura. Se identificaron 56 y 19 genes desregulados en las células HEC-1A tras exposición de 1 h con el DEC- 2G-C16 y el DEC- 2G-S16 respectivamente.

En la tabla 8 y 9 se detallan para cada gen seleccionado, el símbolo, el número de veces que está sobre-expresado o reprimido cada gen (ratio), $\log(R)$ y $\log(I)$ utilizados como valores de abscisas y ordenadas, respectivamente, y el p -valor para ser considerado como diferencialmente expresado.

Tabla 8. Listado de los genes desregulados por el DEC- 2G-C16.

2G-C16				
Gen	Ratio	Log (I)	Log (R)	p-valor
AA541413	2.61	9.34	1.39	0.00186724
AGPAT2	-2.12	10.31	-1.08	0.00493671
ANKRD12	2.37	8.84	1.25	0.00014728
ANKRD21	2.69	8.54	1.43	0.00487054
ARFRP1	-2.05	8.58	-1.04	0.00013506
ASPM	2.09	8.43	1.06	0.04666527
A_24_P890995	-2.27	8.26	-1.18	0.00023336
BC037535	2.03	11.73	1.02	0.00004717
BC090061	3.32	14.07	1.73	0.02581848
BIN3	-2.15	8.42	-1.10	0.00012464
C20orf43	-2.33	9.03	-1.22	0.00002737
CAPZA1	-2.18	8.64	-1.13	0.00113910
CSPP1	2.32	8.01	1.22	0.01682108
CUEDC2	-2.09	10.43	-1.06	0.00030142
CXCR4	2.07	13.56	1.05	0.00004656
DDR1	-2.01	10.50	-1.00	0.00213874
EIF5A	-2.13	11.87	-1.09	0.00003378
ENSA	-2.08	9.77	-1.06	0.00002118
ENST00000265271	2.29	8.89	1.20	0.00375896
ENST00000330640	2.06	10.15	1.04	0.00116402
ENST00000340455	2.57	10.60	1.36	0.00097442
ENST00000369577	2.15	9.43	1.11	0.00250061
FLJ40330	2.24	10.91	1.16	0.00011440
GLS	2.04	11.56	1.03	0.00013219
GLTSCR2	-2.15	12.01	-1.10	0.00146478
GMPPA	2.03	8.59	1.02	0.00029774
HNRPA0	-2.17	10.37	-1.17	0.00332061
I07392	-2.05	8.29	-1.04	0.00209822
LOC647768	2.11	12.18	1.08	0.00472451
LOC649545	-2.44	12.02	-1.29	0.00073990
LRPA1	-2.03	10.27	-1.02	0.00003162
LRRIQ2	2.02	8.80	1.02	0.02564598
MET	-2.29	9.37	-1.19	0.00519093
MLL	2.50	10.34	1.32	0.00885208
NDUFA10	-2.03	9.93	-1.02	0.00005212
NKTR	2.83	10.67	1.50	0.04776386
POTE15	2.21	8.68	1.15	0.04254493
POTE2	2.91	9.74	1.54	0.00778725
PPP1CA	-2.21	11.07	-1.14	0.00053182
PRKCI	2.18	10.94	1.13	0.00055665
PTPLAD1	2.07	11.50	1.05	0.04452266
RP3_402G11.5	2.11	8.53	1.08	0.00356878
SERPINH1	-2.06	9.98	-1.04	0.00002813
SIPA1L3	2.44	10.88	1.29	0.00000402
SMG1	2.79	9.18	1.48	0.00498558
SNRP/0	-2.22	11.00	-1.15	0.00087697
SNURF	-2.03	10.89	-1.02	0.00001645
SYNGR2	-2.19	9.80	-1.13	0.00000883
TAX1BP3	-2.05	10.33	-1.04	0.00005733
THC2598362	2.05	8.40	1.03	0.00248785
THC2733949	2.25	9.91	1.17	0.01558161
TPR	2.77	9.85	1.47	0.01358697
WIISC1L1	2.07	8.79	1.05	0.04443494
ZFP36L1	2.03	13.61	1.02	0.00204312

Representación de los 54 genes identificados en el ensayo genético de la monocapa de HEC-1A tratada durante 1 h con el DEC- 2G-C16 a 5 μ M.

Tabla 9. Listado de los genes desregulados por el DEC- 2G-S16.

2G-S16				
Gen	Ratio	Log (I)	Log (R)	p-valor
ACPT	2.08	10.45	1.06	0.00385876
ANKRD21	2.48	8.55	1.31	0.02980687
ARMC2	2.30	10.45	1.20	0.00520741
BH1HB5	2.73	11.85	1.45	0.03196534
C16orf35	2.04	12.84	1.03	0.03798677
CASP9	2.35	13.12	1.23	0.04631757
DKFZp434L192	2.11	9.16	1.08	0.00500000
ENST00000340455	2.16	10.69	1.11	0.02379377
GRM5	2.48	13.01	1.31	0.02577365
HNRPA0	-2.04	10.40	-1.03	0.00005329
LOC649545	-2.10	12.05	-1.07	0.00726502
LOC650108	-2.07	13.76	-1.05	0.02985751
LOC652524	-2.05	8.62	-1.03	0.01056466
NOS1	2.08	13.37	1.05	0.03147926
POTE2	2.64	9.56	1.40	0.04455638
R11011	2.05	9.78	1.04	0.00283967
SEC14L1	-2.04	9.89	-1.03	0.00117005
SIPA1L3	2.43	10.83	1.28	0.00000630
THC2598362	2.18	8.38	1.13	0.00011874

Representación de los 19 genes identificados en el ensayo genético de la monocapa de HEC-1A tratada durante 1 h con el DEC- 2G-S16 a 5 μ M.

En ninguno de los casos se encontró la presencia de genes relacionados con inflamación, lo que constituyó una prueba muy significativa de la ausencia de factores proinflamatorios en el epitelio vaginal tras la administración de los DEC- en las condiciones experimentales ensayadas.

Con el objetivo de conocer qué funciones podrían estar alteradas en HEC-1A como consecuencia de la exposición a cualquiera de los DEC- utilizados se incluyeron los genes seleccionados en la base de datos Ingenuity Systems®. Esta base de datos contiene información actualizada sobre genes y sus interacciones de tal manera que cuando se introdujo el listado de genes seleccionados como diferencialmente expresados en el experimento, se obtuvieron las redes de interacciones más significativas entre estos genes, así como las funciones más representativas en dichas

redes. El análisis mediante esta aplicación de los genes seleccionados, tanto por exposición a DEC- 2G-S16 como a DEC- 2G-C16, no mostró ninguna red en la cual “inflamación” fuera una de las funciones significativas. En el caso del DEC- 2G-S16 la red principal tuvo como funciones asociadas movimiento celular, muerte celular y cáncer (Tabla 10), mientras que la principal red del DEC- 2G-C16 tuvo como funciones principales afectadas enfermedades dermatológicas, desórdenes genéticos y enfermedades hematológicas (Tabla 11).

Tabla 10. Listado de las 5 principales funciones asociadas a la red de genes desregulados por DEC- 2G-C16.

2G-C16		
Número	Funciones asociadas a la red	Significación
1	Enfermedades dermatológicas, desorden genético y enfermedades hematológicas	45
2	Expresión génica, metabolismo de drogas y desarrollo embrionario	36
3	Expresión génica, modificación de ARN post-transcripcional y cáncer	35
4	Modificación post-transcripcional, ciclo celular, mantenimiento y función celular	33
5	Síntesis de proteínas, organización y ensamblaje celular, modificación post-transcripcional	33

Tabla 11. Listado de las 5 principales funciones asociadas a la red de genes desregulados por DEC- 2G-S16.

2G-S16		
Número	Funciones asociadas a la red	Significación
1	Movimiento celular, muerte celular y cáncer	39
2	Organización y ensamblaje celular y enfermedad neurológica	32
3	Expresión génica, morfología celular y desarrollo celular	30
4	Ciclo celular, morfología celular, crecimiento y proliferación celular	30
5	Función y desarrollo del sistema cardiovascular, morfología del órgano y metabolismo de los aminoácidos	28

4.17. ENSAYO *IN VIVO* DEL DENDRÍMERO ANIÓNICO 2G-S16

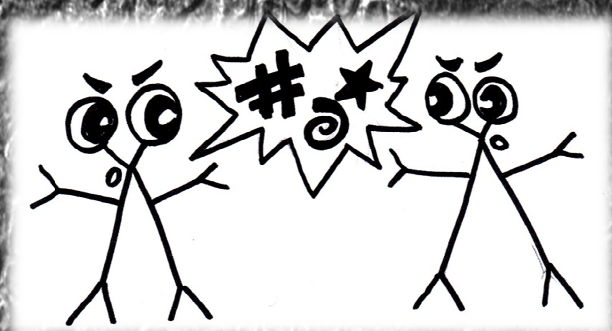
Para evaluar si la administración repetida de DEC- 2G-S16 podía causar irritación vaginal se llevó a cabo un experimento con doce conejos hembra de la raza blanco de Nueva Zelanda divididos en cuatro grupos de tres especímenes que fueron utilizados para determinar el potencial efecto irritable de dos formulaciones de DEC- 2G-S16 tras su aplicación vaginal durante dos semanas (Tabla 12).

Tabla 12. Índice de irritación vaginal en cuatro grupos de conejos hembra blancos de Nueva Zelanda tratados durante dos semanas con DEC- 2G-S16.

	2G-S16-DB*	2G-S16-DA*	Vehículo*	Control Negativo*
Epitelio (0-4) #	0	0,33 ± 1	0,67 ± 1,32	0
Infiltración leucocitaria (0-4) #	0,67 ± 0,5	0,67 ± 0,5	1 ± 0,93	1,22 ± 1,09
Congestión vascular (0-4) #	0,67 ± 0,5	0,44 ± 0,88	1,11 ± 0,93	0
Edema (0-4) #	0	0	0	0
Puntuación de irritación al microscopio*	1,3	1,4	2,8	1,2
Índice de irritación vaginal (0-16) ^Δ	0,1	0,2	1,6	0

Vehículo y control negativo representan PBS y NaCl al 0.9 %, respectivamente. 2G-S16-DB (dosis baja, 1 μM) y 2G-S16-DA (dosis alta, 10 μM). *Media ± SD. # Los valores fueron calculados en base a la media de puntuación estimada en las regiones cervical, media y urovaginal de los tres conejos de cada grupo. Se utilizó el sistema de graduación desde 0 (parámetros normales o ausencia de efectos adversos) hasta 4 (efectos adversos severos) para la examinación microscópica de los tejidos (ISO 10993-10). La puntuación final se expresó como la media ± SD de 9 determinaciones. ¥ La puntuación de irritación al microscopio se corresponde con la suma de los valores de irritación del epitelio, infiltración leucocitaria, congestión vascular y edema (ISO 10993). Δ El índice de irritación vaginal se obtuvo restando el valor medio obtenido por el grupo control negativo al valor de las formulaciones evaluadas. La correlación con potencial irritación humana es: Índice de irritación vaginal < 8: Aceptable; 9-10: Marginal y ≥ 11: Inaceptable (en relación con los valores de Eckstein et al. [11]).

Todos los animales mostraron normalidad clínica a lo largo del ensayo. No hubo mortalidad ni señales de secreción vaginal, eritema o edema en los conejos estudiados a la dosis más baja (1 μ M) y ni a la dosis alta (10 μ M) de 2G-S16. Ninguna anormalidad destacable se observó durante las necropsias y el análisis histopatológico de los tejidos vaginales con el DEC- 2G-S16 en comparación con el control negativo. Los niveles cervical, central y caudal de la vagina en el grupo de 2G-S16-DA no mostraron cambios con respecto al control negativo a excepción de un espécimen que mostró signos focalizados de erosión epitelial. Un mínimo grado de leucocitos (heterófilos y macrófagos) se observó en dos especímenes y en uno de ellos se encontró un grado medio de congestión vascular. No se registraron signos de edema. El índice de irritación vaginal se calculó a partir de la puntuación de las observaciones microscópicas (irritación del epitelio, infiltración leucocitaria, congestión vascular y edema) y los valores de 0,1 y 0,2 para la dosis baja y alta del DEC- 2G-S16, respectivamente, confirmaron la biocompatibilidad del DEC- aplicado en la mucosa vaginal de las conejas.



5. DISCUSIÓN

La primera aplicación biológica de los dendrímeros de estructura carbosilano que se describe en esta Memoria hace referencia a su capacidad de transporte y protección de los ácidos nucleicos. La mayoría de los experimentos en terapia génica y en ensayos clínicos utilizan un vector viral para el transporte del ácido nucleico. Los aspectos de seguridad (inmunogenicidad, oncogenicidad, etc.) y producción a gran escala limitan la aplicación de vectores virales recombinantes [199, 200]. Se conocían las potenciales ventajas de los ODN en terapia antisentido y como inmunomoduladores, en enfermedades como el cáncer, alergia o infecciosas. Pero existían problemas que han hecho difícil que los éxitos obtenidos *in vitro* tuvieran su correlato *in vivo*, siendo casos contados los ODN que se han convertido en fármacos [159, 201]. Entre estos problemas, destacó la dificultad de paso a través de barreras fisiológicas, la escasa biodisponibilidad y la toxicidad derivadas de la unión de los ODN a proteínas plasmáticas y a las superficies celulares [147]. Surgió inmediatamente la pregunta de si la aplicación de los DEC+ al transporte de ODN podría contribuir a resolver o mejorar estos escollos.

Todos los DEC+ utilizados en esta Memoria (N8, N16, NN8 y NN16) fueron capaces de retener la migración del ODN formando un dendriplex, independientemente del tamaño. El ratio de cargas positivas del dendrímero y negativas del ODN se estudió hasta 40/1, obteniendo un ratio de 2/1 como ratio mínimo necesario para la formación del dendriplex. Los DEC+ se encuentran funcionalizados mediante enlaces Si-O con grupos amino en la periferia, por lo que se comprobó que el monómero no formaba dendriplex con el ODN, sino que era necesaria toda la estructura dendrimérica para formar el dendriplex. Los dendrímeros descritos en esta Memoria a pesar de ser de una generación baja (segunda) fueron capaces de retener la migración de ODN, plásmidos y siRNA. La mayor diferencia con los dendrímeros PAMAM+ utilizados como control de formación del dendriplex, a parte de su estructura carbosilano, fue la generación del dendrímero (G4-PAMAM, generación 4 y Superfect®, generación 7) y está descrito que un incremento de la generación conlleva un aumento de la toxicidad [82].

Los DEC+ presentaron una estabilidad relativa en agua y en el estudio del tiempo de liberación del ODN por electroforesis en distintas condiciones, los DEC+ N8, N16, NN8

y NN16 fueron estables a las diluciones utilizadas cuando se estudiaron inmediatamente (30 min) tras formarse el dendriplex y la degradación total de los DEC+ (correspondiente a la liberación de todo el ODN) fue visible a las 24 h, tal como anticiparon los datos espectroscópicos de RMN-¹H. Estos datos concuerdan con los resultados establecidos para otros tipos de dendrímeros utilizando la misma técnica electroforética [202, 203]. En diferentes condiciones de pH, los DEC+ NN8 y NN16 mostraron formar complejos más lábiles liberando el ODN a pH ácido, mientras que fueron estables a pH básico, propiedad que podría ser utilizada para liberación de fármacos polianiónicos controlada por el pH: por ejemplo, en el estómago, donde se acidifica el medio.

Como ya se ha comentado en esta Memoria, una de las principales dificultades de la utilización de ODN en terapias tanto antisentido como inmunomoduladoras, es la gran tendencia de los mismos a la unión a proteínas del plasma [147, 204], que hace necesaria la administración de grandes cantidades de ODN para conseguir suficientes niveles de fracción libre con capacidad de realizar el efecto biológico. En la sangre, los fármacos pueden encontrarse en estado libre, fijados a los eritrocitos o unidos a las proteínas del plasma. La fracción unida a las proteínas del plasma es inactiva y puede considerarse como fármaco en depósito. La interacción fármaco-proteínas plasmáticas disminuye la difusión, retarda la eliminación y prolonga el efecto. Por tanto, todo vehículo que proteja al ODN de la unión a proteínas del plasma, aumentará la fracción libre del mismo, siendo necesaria una menor dosis para tener efecto biológico. Se realizaron estudios complementarios por electroforesis y espectrofluorimetría para cuantificar las interacciones que tenían lugar entre DEC+, ODN y albúmina. Por electroforesis, se confirmó de forma cualitativa la interacción de los ODN con la albúmina, independientemente de su tamaño. Se utilizaron geles de azul paragón para evidenciar la presencia de la proteína y se observó que los dendriplexes a ratio superior a 2/1 no modificaron su comportamiento en disolución acuosa. El ODN del dendriplex fue incapaz de formar complejo con la albúmina en los primeros 20 min y al realizar el gel a las 24 h, se observó la liberación del ODN del dendriplex y la formación del complejo ODN/BSA. Esto fue debido a que la albúmina posee a pH fisiológico (7,4) una carga neta negativa, aportada por los dominios I y II de dicha proteína; sin embargo, la albúmina sérica no es una molécula uniformemente cargada dentro de su estructura; a pH fisiológico el dominio III está ionizado débilmente de forma positiva [205]. Por tanto

los ODN, que presentan una carga negativa, podrían interaccionar con este dominio III, reflejándose esto en la formación de un complejo entre la albúmina y el ODN, como se observó en los resultados obtenidos. La naturaleza de la unión DEC+/ODN es mayoritariamente electrostática, por lo que los DEC+ a ratio superior a 1/1 neutralizaron la carga negativa del ODN, y por tanto impidieron la unión del ODN al dominio III de la albúmina. No se apreció una interacción entre DEC+ y albúmina (unión esperada con los dominios I y II). La dificultad de unión de otros dendrímeros catiónicos como son los PAMAM con la albúmina ya fue descrita previamente [206]. La albúmina, debido a su bajo punto isoeléctrico (4,9) interacciona mejor con dendrímeros poco protonados (básicos) que con los altamente protonados (con muchas cargas positivas). El acceso de las regiones hidrofóbicas de la albúmina a los sitios hidrofóbicos interiores de los PAMAM+ es difícil y las débiles uniones electrostáticas entre los sitios hidrofílicos de la albúmina y la superficie catiónica de los PAMAM+ no permiten una adaptación fácil de las estructuras de ambas macromoléculas [186]. Quizá en este caso esté ocurriendo algo similar en cuanto a la falta de interacción entre los DEC+ con la albúmina: probablemente no haya una interacción muy fuerte entre el interior apolar de los DEC+ con los sitios hidrofóbicos de la albúmina. Las posibles uniones electrostáticas entre DEC+ y albúmina podrían no ser muy fuertes en su naturaleza y por tanto insuficientes para permitir una adaptación estructural estable de ambas moléculas.

Para confirmar que la interacción predominante entre DEC+ y ODN era electrostática, el dendriplex DEC+ NN8/ODN TAR se sometió a la acción del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS). El SDS es el agente disociador más habitual para desnaturalizar proteínas nativas en sus polipéptidos individuales, dotando a la estructura polipeptídica de una densidad de carga uniforme en toda su longitud [202, 207]. El DEC+ NN8 no fue capaz de retener la migración del ODN TAR debido a la disociación producida por las cargas negativas del SDS. La protección del ODN frente a la unión a proteínas plasmáticas en presencia del DEC+ NN8 se observó también en los experimentos con MCC (10 % de STF) y frente a distintos porcentajes de suero humano tipo AB. La electroforesis mostró resultados cualitativos de las interacciones entre DEC+, ODN y BSA. No obstante, por esta técnica no se pueden cuantificar las diferencias de unión entre los cuatro tipos de DEC+ y ODN, la interacción de la albúmina con el

dendriplex o la influencia de DEC+ en el entorno de la albúmina. Estos resultados se obtuvieron mediante medidas espectrofluorimétricas.

La utilización de ODN fluoresceinados y la existencia de dos aminoácidos de triptófano en la albúmina permitió utilizar la espectrofluorimetría para estudiar los cambios conformacionales en las citadas moléculas antes y después de la adición de los DEC+. Los DEC+ N16, NN8 y NN16 se unieron a los ODN GEM91 y SREV de forma efectiva. Los DEC+ NN8 y NN16 se unieron de forma más efectiva al ODN, debido posiblemente a los diferentes grupos terminales de su estructura. Todos los DEC+ poseen grupos $-NMe_3$ cargados positivamente, pero el DEC+ NN8 también posee grupos neutros $-NR_2$ con posibilidad de cuaternizarse, formando grupos catiónicos $-NR_3$ como en el DEC+ NN16. La presencia de dos cargas positivas en cada rama en este último DEC+ y la posibilidad del doble de cargas en el DEC+ NN8 aumentaron la unión efectiva al ODN. El ratio molar de DEC+/ODN para N16, NN8 y NN16 fue de 4 a 7, dependiendo del ODN utilizado, y se describió un patrón de interacción específica a estos valores. Cuando el ratio superó el valor de 7, se observó un patrón de micelación, característico del DEC+ N8, el cual mostró ausencia de interacción específica posiblemente por problemas de solubilidad. Se observó un efecto interesante en función del ODN utilizado: GEM91 se unió de forma más directa a los DEC+ que SREV cuando eran desplazados del complejo con BSA (Tabla 6B). Esto se podría explicar porque los ODN difieren en complementariedad, es decir, difieren en el máximo número de pares C-G y A-T que pueden formar en solución entre dos moléculas del mismo ODN. GEM91 puede formar 3 pares (2 pares C-G y 1 A-T) y SREV puede formar 6 pares C-G. Por lo tanto, existían más interacciones posibles por puentes de hidrógeno entre ODN de SREV que de GEM91 y este hecho disminuyó la unión directa de los DEC+ al ODN [208]. Por el contrario, la interacción con SREV libre fue mayor que con GEM91, probablemente debido a la longitud del ODN (28b vs 25b) (Tabla 3B).

Los resultados obtenidos por interacción de los DEC+ con los ODN se confirmaron utilizando ANS, una molécula que en un ambiente polar presenta una baja intensidad de fluorescencia [209]. La adición de DEC+ produjo un aumento en la

intensidad de fluorescencia de la molécula y un desplazamiento de la emisión máxima a menores longitudes de onda. Estos cambios indicaron que DEC+ interacciona con ANS debido a que esta molécula aumenta su fluorescencia cuando se une a regiones hidrofóbicas en membranas o proteínas [210]. Los resultados sugieren que ANS se localiza en un entorno más hidrofóbico en el DEC+ (la estructura interna carboxilato). Por otra parte, algunos autores defienden que ANS se une a los grupos catiónicos de las proteínas y esta unión depende de la formación del par de iones [211]. Los DEC+ NN8 y NN16 mostraron mayores constantes de unión que los DEC+ N8 y N16. Una segunda generación de DEC+ posee estructuras asimétricas abiertas con capacidad para encapsular ANS. Pero el parámetro n (centros de unión por molécula) de 0.1 a 0.4 en el caso de los DEC+ N8 y N16 sugiere un patrón de micelación frente a una unión molecular. En este caso, de 8 a 3 moléculas rodean una molécula de ANS (ratio molar DEC+/ANS de 8/1 y 3/1, para N8 y N16 respectivamente), mientras que los DEC+ NN8 y NN16 mostraron un ratio molar aproximado de 1/1. Estos resultados mostraron que la interacción de ANS con DEC+ NN8 y NN16 fue más efectiva que con DEC+ N8 y N16.

La extinción de la fluorescencia del BE unido al ADN se ha utilizado para cuantificar la interacción de diferentes ligandos con el ADN, como es el caso de los DEC+ [212]. Se estudió la adición de DEC+ a un complejo formado por ADN_{TT} y BE intercalado, y se observó que el aumento de la concentración de DEC+ disminuyó la intensidad de la emisión de fluorescencia del BE, reflejando una competencia del DEC+ por la unión al ADN_{TT}. Este desplazamiento del BE intercalado en el ADN_{TT} se obtuvo para todos los DEC+ excepto DEC+ N8. La interacción del DEC+ N8 fue tan débil que no se pudo estimar las constantes de asociación utilizando el BE. El orden de las constantes de asociación con el ADN_{TT} fue DEC+ NN16 > DEC+ N16 > DEC+ NN8. Sin embargo, esta medición indirecta de la afinidad de unión puede resultar engañosa debido a que se han propuesto múltiples mecanismos para el desplazamiento del BE, incluidos los cambios conformacionales que modifican la unión y las repulsiones entre las cargas del BE y polímeros de poliamina [213].

El estudio fluorimétrico de la interacción de ODN y DEC+ con la albúmina se llevó a cabo utilizando BSA y HSA, las cuales poseen al menos un residuo de triptófano. En el caso de BSA, un triptófano se encuentra situado en la parte baja del hueco hidrofóbico del subdominio IIA (Trp²¹³) y otro en la zona superficial de la molécula en el subdominio IB (Trp¹³⁴) [193]. La adición de DEC+ NN8 a BSA no afectó a la extinción de la fluorescencia del triptófano interno y externo de la proteína, ni a la polarización de fluorescencia, lo que significaba que el DEC+ NN8 no afectaba a la conformación natural de la proteína en el rango de concentraciones estudiado. Por el contrario, DEC+ NN8 extinguió la fluorescencia del fluoróforo Alexa Flúor unido a la superficie de BSA. Esto indicaba que las interacciones entre los DEC+ y BSA eran débiles y ocurrían preferentemente en la superficie de la proteína. BSA y HSA poseen un punto isoeléctrico similar y una carga neta negativa (4.8 y -17 para BSA y 5.2 y - 15 para HSA), pero con el dominio III positivo (+1 para BSA y +2 para HSA) [214]. La técnica de electroforesis mostró la interacción entre los ODN y los dominios catiónicos de la albúmina, pero no aclaró si en ausencia de interacciones electrostáticas entre los DEC+ y los dominios aniónicos de la proteína, existía otro tipo de interacción. Con este objetivo, se utilizaron agentes de extinción conocidos para estudiar el efecto de los DEC+ en la interacción BSA-Extintor. Para ello, se utilizó un extintor neutro (acrilamida) y dos iónicos (CsCl y KI). Los extintores iónicos no penetran en la matriz de la proteína, por lo que la extinción de la fluorescencia se debe principalmente al residuo de triptófano superficial [186]. Los DEC+ N8 y N16 presentaron un patrón similar a la extinción sin DEC+ en el medio, mientras que los DEC+ NN8 y NN16 disminuyeron el efecto de la acrilamida. Una posible explicación fue la unión de los DEC+ con nitrógenos internos (NN8 y NN16) a la superficie de la proteína, restringiendo el acceso de la proteína al extintor. En el caso de KI se sugirió una explicación similar, mientras que para CsCl, lo más probable sería una interacción directa de CsCl con los DEC+ NN8 y NN16.

Por último, se estudió la interacción de BSA con los dendriplexes DEC+/GEM91 y DEC+/SREV. En presencia de BSA, la polarización de la fluorescencia de los dendriplexes N8 y N16 decreció de 100 % a 75 %, mientras que los dendriplexes NN8 y NN16 no variaron significativamente. Los resultados indican que la albúmina altera las micelas formadas por los primeros dendriplexes interaccionando fuertemente con el ODN y el DEC+. Por el contrario, la albúmina no afecta a los dendriplexes formados por los DEC+

NN8 y NN16. La interacción entre la albúmina y los dendriplexes fue también estudiada formando el complejo BSA/ODN y añadiendo concentraciones crecientes de dendrímero. Se observó que la adición de dendrímero aumentó la polarización de la fluorescencia del ODN de manera similar a la interacción DEC+/ODN en ausencia de BSA estudiada previamente. La competencia entre DEC+ y BSA por la unión al ODN mostró una alteración del complejo BSA/ODN en presencia de DEC+ N16, NN8 y NN16 (formación de un complejo más estable entre los DEC+ y el ODN).

En resumen, los resultados obtenidos con las técnicas de electroforesis y espectrofluorimetría muestran: primero, que los DEC+ pueden unir pequeñas moléculas como los ODN; segundo, los DEC+ N16, NN8 y NN16 pueden interaccionar con el ADN y desplazar el BE intercalado; tercero, los DEC+ NN8 y NN16 pueden unirse a una proteína y disminuir su interacción con otras moléculas; cuarto, los DEC+ NN8 y NN16 forman un dendriplex estable con los ODN que protege a éstos de su unión a BSA y quinto, los DEC+ NN8 y NN16 no forman complejo con BSA.

Los dendriplexes fueron evaluados mediante las técnicas más avanzadas de caracterización molecular y se obtuvieron los datos de potencial zeta, diámetro hidrodinámico y estabilidad acuosa para cada dendriplex [215]. A ratio 3/1, se obtuvo un valor de potencial zeta de +10 mV para los DEC+ N16 y NN16 y +20 mV para los DEC+ N8 y NN8. Pese a que los complejos con carga neta positiva facilitan la adsorción celular y la internalización mediante endocitosis al interior celular, un exceso de cargas positivas puede resultar citotóxico debido a la unión no específica de partículas a las superficies biológicas y componentes de la sangre, dando lugar a la activación del complemento cuando se administra el dendriplex [28]. El diámetro hidrodinámico mostró valores de 75-240 nm a ratio 1/1, siendo para el dendriplex DEC+ NN16/ODN de 230-240 nm, similar a otros vectores no virales que forman complejo con ácidos nucleicos [216]. Los valores inferiores a 5 μ m previenen problemas de embolia capilar debido a agregación del ADN y el vector no viral utilizado, y valores entre 30 y 500 nm son ideales para el paso a través de los poros entre células endoteliales discontinuas [28]. Solo los complejos relativamente pequeños son capaces de atravesar los capilares sanguíneos e

interaccionar directamente con las células parenquimales. Además, los DEC+ NN8 y NN16 se estudiaron para formar un dendriplex con siGAG1 (siRNA antiVIH) y se obtuvo un tamaño de 270 nm y 300 nm, respectivamente [217].

En relación con la estabilidad acuosa, los resultados del grupo de la Dra. Bryszewska mostraron una degradación dependiente del dendrímero estudiado en un rango de 100-300 min [215]. Para el dendriplex DEC+ NN16/ODN, el mayor grado de polarización se correspondió con una menor estabilidad, iniciando su degradación a los 100 min. La estabilidad no dependió del ODN utilizado pero sí de las condiciones del entorno (tipo de solución tampón, concentración y temperatura). Por esta razón, se deben considerar las variaciones a la hora de medir la degradación mediante electroforesis, espectrofluorimetría o RMN, obteniendo resultados complementarios desde el inicio de la degradación próximo a 1 h hasta la degradación completa a las 24 h. Por tanto, basándonos en la literatura y en los resultados biofísicos obtenidos, los DEC+ N16, NN8 y NN16 mostraron un excelente potencial como vehículos de ODN antisentido, ejerciendo una protección frente a la unión a albúmina y liberando el ODN en menos de 24 h.

La primera condición a cumplir por cualquier molécula que aspira a poder ser utilizada en un sistema biológico es ser biocompatible. Aunque muchos autores utilizan líneas celulares para el estudio de nuevas nanopartículas (siendo las fibroblásticas de las más comunes [218]), las líneas celulares inmortalizadas presentan la desventaja de una mayor resistencia a la toxicidad y una mayor actividad metabólica que las células procedentes de cultivo primario, no reflejando de forma exacta la realidad en cuanto a resistencia a tóxicos y comportamiento biológico [28]. En esta Memoria se ha utilizado un modelo más fisiológico como son las CMSP, un cultivo primario que se obtuvo de células de cordón umbilical de neonatos y adultos. En un trabajo previo realizado en el grupo se mostró que dendrímeros comerciales tipo PAMAM+ eran altamente tóxicos en CMSP mediante el marcaje de Anexina y 7AAD por citometría de flujo [68]. Estos resultados eran contradictorios con los obtenidos por Kukowska-Latallo y col. en los que se mostraba una toxicidad mínima de los PAMAM+ en distintas líneas celulares [202],

pero estaban en concordancia con los obtenidos por Roberts J.C. y col. que encontraban que los PAMAM+ eran hemolíticos y citotóxicos [90] y Domański y col. que encontraban que los PAMAM+ inducían hemaglutinación [219]. Estos autores atribuían la toxicidad de los PAMAM+ a la acción de las aminas periféricas de los mismos sobre las proteínas y fosfolípidos de la membrana celular.

En primer lugar se estudió la toxicidad de los DEC+ por sí solos, sin formar complejos con el ADN y se observó una buena viabilidad celular hasta una concentración de 5 μ M de los DEC+ N8, N16, NN8 y NN16, aunque el DEC+ NN8 mostró una mayor biocompatibilidad a dosis más altas. Posteriormente se estudió la citotoxicidad de los dendriplexes y se observó que eran menos tóxicos que los DEC+, probablemente debido a la neutralización de las cargas como en el caso de dendriplexes de PAMAM+ o PPI+ con ADN [82]. Los dendrímeros más tóxicos fueron los PAMAM+ utilizados como control (SF y G4). Finalmente, se observó que los DEC+ N8, N16, NN8 y NN16 no producían un incremento de la proliferación celular en CMSP.

Los resultados biofísicos mostraron que los DEC+ NN8 y NN16 eran los vehículos con mayor potencial en terapia génica de los cuatro estudiados. El doble de cargas positivas que portaba el DEC+ NN16 frente al DEC+ NN8 favoreció el estudio del primero y debido a que la toxicidad es dependiente del tipo celular sobre el que se evalúe, se amplió el estudio de DEC+ NN16 utilizando diferentes cultivos primarios y líneas celulares. El DEC+ NN16 no fue tóxico en ninguna de las poblaciones celulares estudiadas susceptibles de ser infectadas por el VIH (CMSPs, CD, macrófagos, SupT1, U87, SK-N-MC, K-562 y JEG-3) hasta una concentración de 5 μ M.

En la literatura existe una fuerte controversia sobre la capacidad de los ODN para penetrar en las células vivas; mientras que la postura más clásicamente defendida es que los ODN presentan una gran dificultad para penetrar a través de la membrana plasmática [147], otros autores hablan de la presencia de sitios de unión en la superficie celular que facilitan este proceso [220] y de la entrada de los ODN inducida por mitógenos [195]. Para aclarar este punto, se propuso evaluar la capacidad de entrada de

ODN anti-VIH en el modelo de CMSP estimuladas. Se pretendía además evaluar el comportamiento del dendriplex en dicho modelo. Hay que decir que clásicamente, las CMSP son células difíciles de transfectar con cualquier tipo de ácido nucleico, siendo necesaria la utilización de medios electrofísicos tales como la electroporación [71, 221]. Sin embargo, se observó una gran facilidad de entrada de los ODN en CMSP. Se demostró mediante microscopía confocal que los ODN eran captados en un periodo relativamente corto de tiempo, mostrando un patrón citoplasmático a las 4 h de ser añadidos al cultivo y un patrón mixto (citoplásmico y nuclear) a las 24 h. En ambos casos el patrón de distribución fue difuso, demostrando que, si la captación del ODN era a través de un proceso de endocitosis, el ODN debía de haber salido del compartimento endosoma-lisosoma antes de poder internalizarse en el núcleo a las 24 h. Este fenómeno de captación fue generalizado en casi la totalidad de la población del cultivo, siendo independiente además de la longitud de los ODN ensayados y del donante utilizado (se repitió con las CMSP de distintos donantes adultos y de cordón umbilical de neonatos). Esta incorporación del ODN no inducía mortalidad celular, tal como quedaba demostrado por la utilización de marcajes con azul tripán en las células tratadas con ODN. Por tanto estos datos venían a contradecir lo publicado en la literatura acerca de la dificultad de entrada de los ODN en las células, sobre todo en los cultivos primarios. Además, el estudio de entrada de ODN en linfocitos T CD4+ y monocitos CD14+ a distintos tiempos confirmó la internalización del ODN dependiendo del tipo celular, siendo en todos los tiempos estudiados superior en monocitos que en linfocitos. Al realizar un análisis de las diferentes poblaciones por microscopía confocal, se obtuvieron tres patrones de distribución intracelular distintos: Un patrón difuso y citoplasmático a las 24 h en un 65 % de los linfocitos, independientemente de si procedían de adultos o de cordón umbilical de neonatos; un patrón difuso, citoplasmático y nuclear único de los linfocitos; y un patrón de agregados citoplasmáticos muy característico en monocitos, de aproximadamente 2 μm de longitud. En resumen, tanto las CMSP estimuladas como las no estimuladas, provenientes de adultos o de cordón umbilical de neonatos, mostraron un patrón de internalización del ODN dependiente del tiempo, con una entrada máxima a las 24 h de incubación. El porcentaje de células con ODN incorporado fue siempre superior en monocitos que en linfocitos y la entrada en linfocitos estaba inducida por el nivel de estimulación celular. Las características especiales de las células de cordón umbilical (ej. inmadurez inmunológica) no evitaron la internalización del ODN y por esta razón podrían ser utilizadas para ensayos terapéuticos con ODN antisentido.

La capacidad de entrada de los dendriplexes también se estudió en CMSP. Los cuatro DEC+ estudiados demostraron una captación del dendriplex con un patrón similar a la conseguida por el ODN sin DEC+, (es decir difusa, citoplásmica y nuclear), aunque también se detectó la presencia de pequeñas bolitas fluorescentes que por el tamaño en nanómetros, probablemente correspondían a los dendriplexes. El patrón de entrada en agregados que se observó en el tratamiento de monocitos con el ODN se repitió en los ensayos de entrada con dendriplex. Dada la gran capacidad que mostraron las CMSP para captar ODN por sí solas, fue difícil mejorar esa circunstancia mediante el uso de los DEC+; no obstante, en algunos experimentos, al cuantificar mediante el *software* del microscopio confocal las UAF correspondientes a la fluorescencia del ODN emitidas por las células tratadas con dendriplex o con ODN solo, se observó una mayor emisión cuantitativa de UAF cuando se utilizaron DEC+ NN8/ODN y DEC+ NN16/ODN que con el ODN solo; sin embargo, para comprobar este particular se realizaron series de repeticiones ensayando en paralelo dendriplexes y ODN solos, con CMSP de distintos pacientes y con hasta 7 repeticiones de cada serie en cada ensayo, llegándose a la conclusión de que no se podía evidenciar una diferencia a favor de los dendriplexes con respecto al ODN solo. Por tanto, los DEC+ no parecían interferir con el proceso de entrada del ODN.

En la literatura existen numerosos ejemplos de dendrímeros como agentes de transfección [84-86], pero la funcionalidad de los mismos una vez alcanzado el interior celular no se ha demostrado siempre [157, 160]. Se realizaron pruebas funcionales para estudiar la inhibición de la replicación del VIH lograda mediante la utilización de los ODN antisentido solos o vehiculizados por DEC+. Estos ensayos contaron con una dificultad: se encontró una inhibición similar con los ODN antisentido que con los sentido (utilizados estos como control en experimentos anteriores). Esto fue previamente descrito para los ODN fosforotioato debido a efectos no específicos de secuencia [222], los cuales serían los responsables de una gran parte de los efectos inhibitorios de los mismos (interferencia con la entrada del virus por la presencia de moléculas de ODN en la membrana de las CMSP, impedimento estérico con los procesos de replicación del VIH e interferencia con las enzimas utilizadas por el VIH). Esta circunstancia complicó el análisis. No obstante, se obtuvieron valores similares de inhibición con la utilización de los dendriplexes que con los ODN solos. Para aumentar las diferencias significativas en el

efecto de inhibición, se realizaron mezclas de ODN frente a diferentes regiones del VIH. De esta forma, se obtuvo una diferencia significativa de aproximadamente un 60 % ($p < 0.05$) en la inhibición de la replicación del VIH_{NL4.3} en células MT-2 a las 24 h, utilizando la combinación de ODN TAR y SREV formando dendriplex con DEC+ NN16. Además, para el dendriplex DEC+ NN16/ODN TAR y DEC+ NN16/ODN TAR+GEM91 también se obtuvieron porcentajes de inhibición significativos de alrededor del 40 % ($p < 0.05$) y en ninguno de los casos las células tratadas mostraron daño celular utilizando la técnica de liberación de LDH. En el cultivo primario de CMSP infectadas con VIH_{NL4.3} se realizó el mismo estudio de inhibición. Se obtuvo que el DEC+ NN16 no interfería en la replicación del VIH_{NL4.3} como se demostró con los DEC+ N8, N16 y NN8 en experimentos anteriores y el dendriplex DEC+ NN16/ODN TAR-GEM91 mostró una inhibición significativa de un 60 % ($p < 0.05$). La ausencia de toxicidad por la técnica de liberación de LDH confirmó que la inhibición de la replicación del VIH_{NL4.3} fue debida al efecto del dendriplex DEC+ NN16/ODN ya que no se produjo un incremento en la toxicidad de las CMSP. Estos resultados se correlacionaron con lo observado en microscopía confocal en lo referente a la entrada de los ODN o de los dendriplexes, mostrando que la presencia de los DEC+ no interfería con los efectos inhibitorios de los ODN. Pion y col. han publicado recientemente que el DEC+ NN16 aumenta la entrada del péptido gp160 al interior de las células dendríticas sin influir en las funciones vitales de las células, un requisito importante para utilizar el DEC+ NN16 como vehículo de liberación de antígeno en terapia inmune con células dendríticas [223].

Se realizaron experimentos preliminares de la biodistribución del dendriplex formado por DEC+ NN16/ODN TAR. Se aplicó una administración vía intravenosa de dos concentraciones de DEC+ NN16 (43,5 μ M y 14,5 μ M) formando un dendriplex con el ODN TAR a ratio 2/1 en ratones hembra BALB/c. El sacrificio de los ratones se realizó a los 30 min tras la inyección y se observó la presencia del dendriplex en los pulmones, en el hígado y en el bazo, con una intensa presencia en la vejiga. Estos datos confirman lo publicado por el grupo de Duncan y col [81], donde tras 1 h de inyección intravenosa e intraperitoneal de PAMAM+ marcados con I¹²⁵, la acumulación fue principalmente en el hígado (30-90 %) y se recogió menos de un 2 % en sangre de los dendrímeros catiónicos. Estos datos explican la acumulación del DEC+ NN16/ODN TAR en la vejiga a los 30 min y además sugiere que las modificaciones terminales son muy importantes para evitar la

rápida eliminación hepática. Otros estudios confirman también estos resultados preliminares, con una biodistribución preferente en hígado y bazo [90, 224]. Se están diseñando nuevos dendrímeros marcados para su visualización *in vivo* independiente de la unión a ODN fluoresceinados y que conserven su periferia catiónica con la síntesis añadida de un fluorocromo, como los dendrímeros de fósforo propuestos por el grupo de Majoral [225].

La segunda aplicación biológica de los dendrímeros de estructura carbosilano que se describe en esta Memoria hace referencia a su capacidad anti-VIH por efecto de los grupos aniónicos de la periferia. Desde mediados de los años noventa, se investiga en nanopartículas con potencial microbicida que interfieran de algún modo en el mecanismo de entrada del VIH a través del epitelio vaginal [17]. Este tipo de microbicidas que no son específicos del VIH, ya que pueden actuar frente a otras ETS, reciben el nombre de microbicidas de primera generación. Los dendrímeros se encuentran en esta primera clasificación y el dendrímero con mejor potencial microbicida es un dendrímero aniónico basado en 32 grupos naftaleno sulfonato en la periferia (SPL7013, llamado comercialmente VivaGel™) [39]. En la actualidad, existen seis microbicidas de primera generación estudiados en ensayos de eficacia fase IIB/III que no han mostrado una reducción significativa en la infección por el VIH [226]. De hecho, dos de esos microbicidas mostraron un incremento de la infección por el VIH asociado al daño causado en el epitelio vaginal (nonoxinol-9 y sulfato de celulosa). Por esta razón, se sintetizaron tres generaciones de tres tipos de DEC- con un interior biocompatible carbosilano y una superficie aniónica con potencial microbicida. Se estudió la viabilidad de células de endometrio (HEC-1A) como primera barrera frente a la transmisión heterosexual del VIH en presencia de los DEC-, así como en una línea celular linfoide (MT-2) y un cultivo primario de CMSP. Los DEC- estudiados fueron nueve, seis con núcleo de silicio y terminaciones carboxilato y sulfonato (1G-C8, 2G-C16, 3G-C24, 1G-S8, 2G-S16 y 3G-S24) y tres con núcleo polifenólico y terminación sulfonato (1G-O3S12, 2G-O3S24 y 3G-O3S48). No se observó al microscopio óptico señales de agrupamiento celular ni cambio de morfología en ninguna de las concentraciones estudiadas, excepto para la concentración de 50 μ M con el DEC- con terminación carboxilato 3G-C32. Por el ensayo de liberación de LDH y MTT, se fijó una concentración biocompatible de hasta 20 μ M con los nueve DEC- en HEC-1A, MT-2 y CMSP. Se

seleccionó la segunda generación de los tres tipos de DEC- con núcleo de silicio o núcleo polifenólico por haber presentado mejores resultados de solubilidad y toxicidad y se estudió su viabilidad en CMSP, la población celular más sensible a la concentración de 20 μM . Las segundas generaciones de los tres tipos de DEC- (2G-C16, 2G-S16 y 2G-O3S24) no mostraron toxicidad en CMSP a 10 μM . Por tanto, los DEC- con grupos funcionales similares (sulfonatos) y distinta estructura interna (núcleo de silicio de 2G-S16 frente a núcleo polifenólico de 2G-O3S24) se comportan de forma similar en los cultivos celulares. Las terceras generaciones mostraron problemas de solubilidad en determinados experimentos y se seleccionaron las segundas generaciones de los DEC- con núcleo de silicio y distintos grupos funcionales (2G-S16 y 2G-C16) para realizar un protocolo de biocompatibilidad más amplio: no se observó toxicidad a 10 μM en ninguno de los cultivos celulares estudiados (CMSP, eritrocitos, M ϕ y CD) y tampoco se observó un incremento de la proliferación de las CMSP ni a 10 μM ni a 50 μM . Los DEC- 2G-S16 y 2G-C16 habían demostrado no ser tóxicos ni mitogénicos a la concentración de 10 μM .

Para su posible uso como microbicida, se evaluó la capacidad de los DEC- 2G-S16 y 2G-C16 para interaccionar con el VIH-1_{NL4-3} en el proceso de infección de las células epiteliales HEC-1A, las cuales se infectan selectivamente con virus X4 pero no con virus R5 [227]. Aunque se ha detectado ADN proviral integrado en el genoma de las células, la producción viral es muy baja. Con el objetivo de poder utilizar los DEC- en la formulación de un gel vaginal de uso tópico, las células HEC-1A se pre-trataron 2 h, 1 h y 30 min antes de infectarlas con el VIH-1_{NL4-3} con los DEC- 2G-S16 y 2G-C16 a una concentración de 10 μM . Se seleccionó el pre-tratamiento de 1 h con los DEC- 2G-S16 y 2G-C16 por haber mostrado una eficacia de inhibición superior al 50 % y por el posible uso del futuro gel microbicida previo al coito, bien sea por administración tópica una hora antes o por liberación a lo largo del tiempo desde un dispositivo vaginal. Los DEC- 2G-S16 y 2G-C16 a la concentración de 10 μM mostraron una inhibición de la internalización del VIH-1_{NL4-3} en HEC-1A superior al 50 %, por lo que estas moléculas podrían actuar como una barrera física en la prevención de la transmisión viral del VIH a través de células endometriales y de su paso a la cavidad interna del útero. Se seleccionó el DEC- 2G-S16 para desarrollar nuevos experimentos de transmisión viral por haber mostrado éste un mayor porcentaje de inhibición de la infección e internalización del VIH-1_{NL4-3} en HEC-1A.

En CMSP, el DEC- 2G-S16 mostró efecto profiláctico y terapéutico a tratar las células 1 h antes y 1 h después de la infección por VIH_{NL4.3}, respectivamente. Este mecanismo post-infección ha sido descrito para otras nanomoléculas aniónicas [228] y se debe principalmente a dos situaciones: una interacción irreversible del compuesto a la superficie celular que desencadena una serie de eventos que inhiben algún paso de la replicación viral o bien una internalización del compuesto que se une a otras dianas virales en el interior celular. Posteriormente, se estudió la interacción directa de DEC- 2G-S16 durante 1 h con los aislados virales VIH-1_{NL4-3}, VIH-1_{BaL} y VIH-2_{CBL23} y VIS_{mac239} y se observó que se redujo de forma significativa la capacidad infectiva de las partículas virales, obteniendo para el VIH-1_{NL4-3} el mayor porcentaje de inactivación viral. La transmisibilidad del virus libre frente al asociado a célula es todavía incierta [229], pero ambos motivos deben ser abordados por la terapia microbicida. Aunque la mayoría de las infecciones en la etapa aguda se producen por la interacción del VIH con el correceptor CCR5, se ha visto que el virus con tropismo X4 no puede ignorarse en el diseño de una nueva estrategia antiviral [229]. Por otra parte, aunque el receptor principal del VIH es el CD4, existe un mecanismo de infección independiente de esta unión, el cual predomina en el VIH-2 y VIS [5]. Los cuatro ejemplos citados fueron utilizados en los experimentos de inactivación viral y se observó que el DEC- 2G-S16 a una concentración de 10 μ M disminuyó significativamente la infectividad de las cepas VIH-1_{NL4-3} y VIH-1_{BaL} en aproximadamente un 100 % tras 1 h de contacto. En cambio, las cepas virales VIH-2_{CBL23} y VIS_{mac239} redujeron su capacidad infectiva en un 60 % y 50 %, respectivamente. Esto sugirió que la interacción con la gp120 del virus predominaba en el mecanismo de acción del DEC- 2G-S16. Destaca en este experimento la inactivación del VIH-1_{NL4-3} por el DEC- 2G-S16 a la concentración de 1 μ M. La tercera región variable (V3) de la glicoproteína de la envuelta del VIH-1 determina si el virus se une a CCR5 e infecta preferentemente macrófagos o se une a CXCR4 e infecta principalmente células T [230]. El grupo del Dr. Maly está estudiando mediante modelaje computacional los DEC- 2G-S16 y 2G-C16 y ha observado que forman complejos estables con gp120 y CD4, uniéndose en zonas cruciales para la interacción de gp120 con el receptor CD4 o con los co-receptores CXCR4 y CCR5 [231]. Es posible que la interacción de las cargas aniónicas del DEC- 2G-S16 con la gp120 sea más intensa en el caso de cepas virales X4 que en cepas virales R5, debido a la variación en los aminoácidos de la región. Esta interacción con la V3 *loop* de la gp120 ha sido descrita para otras nanomoléculas aniónicas con potencial microbicida [228].

Para estudiar el efecto antiviral del DEC- 2G-S16 en una línea vaginal distinta a las células HEC-1A, se utilizó la línea de endocervix VK2/E6E7. Se observó un efecto inhibidor significativo de la infección del VIH-1_{NL4-3} a partir de una concentración del DEC- 2G-S16 de 1 μ M. Está descrito que no todas las líneas de epitelio vaginal integran el ADN proviral, a pesar de secuestrar y liberar el virus al sobrenadante de cultivo [227]. Por tanto, es posible que el efecto anti-VIH sea más eficaz en células con un comportamiento distinto al de las células HEC-1A, donde se integra el ADN proviral para la producción de nuevas partículas infectivas es prácticamente nula [227, 232].

Para el estudio de la inhibición de la transmisión del VIH a través de una monocapa de células epiteliales, se estudió la formación de una monocapa de células HEC-1A y VK2/E6E7 en dispositivos *transwell*. Este modelo del tracto genital femenino *in vitro* se elaboró con el objetivo de mimetizar el epitelio columnar simple (Fig. 89A) y el epitelio plano estratificado (Fig. 89B) correspondientes al útero y la vagina, respectivamente [17]. Un modelo similar se ha publicado recientemente por el grupo de Vanham y col. y se muestra la utilidad de estos dispositivos de *transwell* para el estudio de la transmisión del VIH y el efecto de los microbicidas [198]. Se estableció un tiempo de 7 días para la correcta formación de la monocapa y se cuantificaron los valores de TEER durante el transcurso del pre-tratamiento de 1 h con el DEC- 2G-S16. La monocapa no sufrió ninguna alteración durante esa hora, pero la adición de VIH_{NL4.3} disminuyó los valores de TEER. Este dato estaba en concordancia con los obtenidos por Nazli y col. recientemente [233]. EL VIH reduce la barrera de resistencia eléctrica de las células epiteliales y penetra en la zona inferior del epitelio. Por tanto, cualquier microbicida que limitara o evitara la interacción de la proteína gp120 del VIH con las células de las mucosas del tracto genital podría tener mayor probabilidad de éxito.

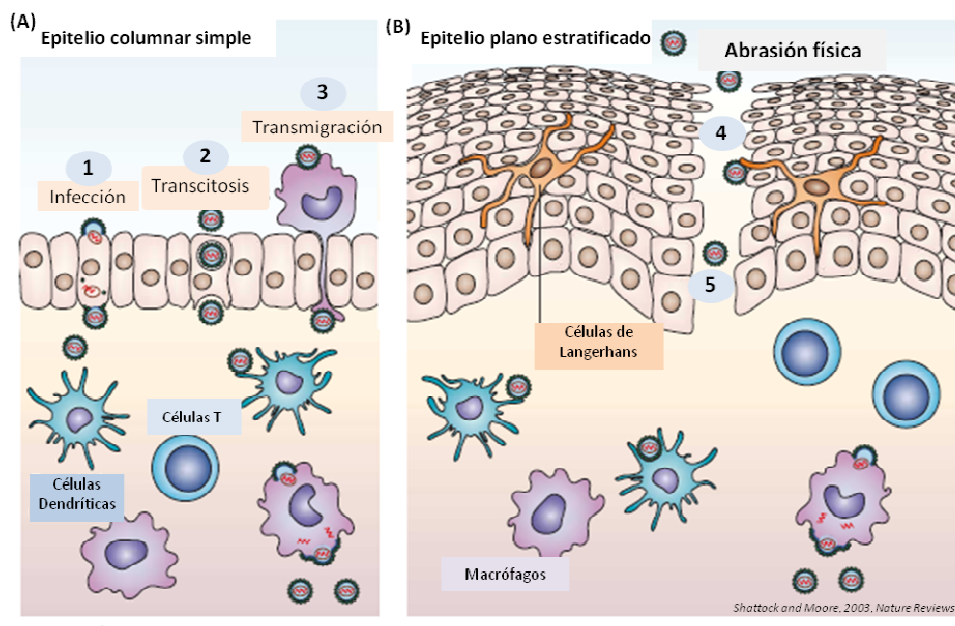


Fig. 89 Transmisión del VIH a través de la mucosa epitelial. (A) Epitelio columnar simple y (B) Epitelio plano estratificado. 1. Infección directa de las células epiteliales. 2. Transcitosis a través de células epiteliales y/o células especializadas de transporte. 3. Transmisión epitelial de células infectadas. 4. Captación por células de Langerhans intraepiteliales. 5. Paso a través de la barrera epitelial por fisuras en la monocapa.

En el modelo *in vitro* de HEC-1A en dispositivos de *transwell* el DEC- 2G-S16 mostró una reducción de partículas virales en el sobrenadante basolateral en más de un 30 % con los aislados virales VIH-1_{NL4-3} y VIH-1_{BaL}, y de un 10 % con el aislado viral VIH-2_{CBL23}. Además, los valores de TEER no disminuyeron de forma drástica cuando el DEC- 2G-S16 estaba presente a una concentración de 10 μ M e incluso de 100 μ M, lo que sugiere una interacción del DEC- 2G-S16 con la proteína gp120 del VIH, como hemos mencionado anteriormente. Sorprendentemente, a una concentración de 100 μ M el DEC- 2G-S16 no afectó al valor de TEER durante la hora que se estudió en las células HEC-1A. Esto puede ser debido a que la toxicidad del DEC- 2G-S16 es menor sobre una monocapa de células HEC-1A o a que el DEC- 2G-S16 no está afectando a las *tight junctions*, por lo que los valores de TEER permanecen constantes a lo largo del tiempo. El estudio de la fuerza de unión entre el DEC- 2G-S16 y las diferentes gp120 de cada cepa del VIH no estaba en los objetivos de esta Memoria, pero diversas técnicas pueden ser utilizadas para este análisis, como por ejemplo el biosensor de resonancia de plasmón superficial (*SPR*) [228]. El DEC- 2G-S16 no solo actuó impidiendo el paso de las

partículas virales a través de la monocapa de HEC-1A, sino también reduciendo la infectividad de las mismas. Se observó una reducción de la infectividad en torno al 20 % con las cepas virales VIH-1_{NL4-3}, VIH-2_{CBL23} y VIS_{mac239}, mientras que con el VIH-1_{BaL} la reducción significativa fue de más del 50 %. En todos los casos, el DEC- 2G-S16 tuvo un efecto similar al obtenido con la molécula aniónica suramin a la misma concentración de 10 μ M. Es probable que la interacción del DEC- 2G-S16 con la región V3 en un virus X4 sea más intensa que en el caso de un virus R5 y la presencia de partículas virales es por tanto menor en la cámara inferior, pero una vez atravesada la barrera epitelial, el mecanismo de transmisión utilizado por el virus puede reducir la infectividad [17]. Esta reducción posiblemente es más pronunciada en presencia de un polianión como es el caso de suramin o el DEC- 2G-S16 debido a otras interacciones implicadas en la unión DEC- 2G-16/ VIH-1_{BaL}, no solo electroestáticas.

Como se observa en la figura 89, existen múltiples mecanismos de transmisión del VIH a través del epitelio vaginal. Las CDi y los M Φ son dianas de muchas situaciones clínicas debido a su participación central en el control de la inmunidad; Una transmisión efectiva del VIH a través de las barreras epiteliales permite una captación del VIH por las células dendríticas migratorias o por los macrófagos de tejido (mediante DC-SIGN, otro receptor de lectinas tipo C, receptores de manosa o proteoglicanos de heparán sulfato) y la posterior diseminación a los nódulos linfáticos [234, 235], pero también favorece una infección localizada en la mucosa que induce el reclutamiento de células adicionales susceptibles de ser infectadas por el VIH [236]. En definitiva, dado que estas células residen en las mucosas y se internalizan hacia el tejido linfático en su proceso de maduración, juegan un papel primordial en la diseminación inicial de la infección, además de actuar también como reservorios desde donde continuamente se infectan células T CD4. Se estudió el efecto del DEC- 2G-S16 en la prevención de la infección por VIH-1_{NL4-3} y VIH-1_{BaL}, ya que durante la transmisión del virus la cepa R5 es predominante [237]. Aunque el mecanismo de esta transmisión no es totalmente conocido, números estudios demuestran que esta transmisión selectiva sería debido a una acumulación de varios factores: presencia de receptores, factores celulares y factores extracelular como las citocinas producidas de manera locales [238]. El pre-tratamiento de M Φ y CDi con el DEC- 2G-S16 produjo una reducción significativa en la producción de VIH-1_{NL4-3} pero no de VIH-1_{BaL}. El efecto de interacción electrostática entre la región V3 de la gp120 del

VIH-1_{NL4-3} (con mayor carga neta positiva que su homóloga en VIH-1_{BaL}) fue descrito anteriormente y parece dominar en la inhibición de la infección en MΦ. En el caso de las CDi, aunque el porcentaje de inhibición de la infección es similar, la reducción solo fue significativa con el VIH-1_{NL4-3}, por lo que la reducción de la captación de partículas virales fue impedida por la presencia del DEC- 2G-S16. *In vitro*, los polianiones son menos potentes frente a los virus R5 pero se desconoce si este efecto limitará su eficacia *in vivo* [239]. Por último, se realizó un experimento que combinaba el efecto pre-tratamiento con el DEC- 2G-S16 en las células MΦ y CDi y la liberación de las partículas virales tras 24h al sobrenadante. Este experimento se utilizó para estudiar la capacidad infectiva del VIH liberado por las células que habían sido expuestas al DEC-2G-S16 y se comprobó que el VIH-1_{NL4-3} y el VIH-1_{BaL} redujeron la infectividad de CMSP activadas en más de un 90 %. Esto indicó que el DEC- 2G-S16 puede interferir no solo en el bloqueo de la transmisión del VIH a través del epitelio vaginal, si no en la infección de las poblaciones susceptibles de ser infectadas por el VIH. La complejidad de este estudio y del análisis de los resultados proviene de la diferencia entre infección directa de las células y de la captura de partículas virales. Por eso, se debe de tener en cuenta que la mayoría de los virus cuantificados en el sobrenadante de las CDi [240] y de los MΦ infectados provienen de virus capturados y re-largados en el medio extracelular, explicando el poco efecto de los productos antivirales dentro de las CDi y de los MΦ infectados [240, 241]. Estos dos tipos celulares tienen la capacidad de capturar y retener las partículas virales enteras e infecciosas sin ser directamente infectadas. Aunque la cepa R5 está capturada por estas células como la cepa X4, el virus R5 puede infectar con mayor facilidad las CDi y de los MΦ permitiendo producir nuevas partículas infecciosas [237]. Este proceso explicaría por qué solamente en el caso del VIH_{BaL} se ve que los antirretrovirales son en parte efectivos. Explicaría también por qué el DEC- 2G-S16 es significativamente activo para la cepa X4 que sufre solamente el proceso de captura, mostrando que el DEC- 2G-S16 permite o bien la disminución de la captura del X4 o bien impide soltar este virus. En el caso de la cepa R5, la hipótesis es que una parte de la captura puede ser impedida por el DEC- 2G-S16, pero que una parte del virus podría integrarse y replicarse, explicando que se observe una disminución de producción de antígeno p24 en el medio extracelular por la cepa R5 pero no significativamente diferente de la condición no tratada. Además, la utilización de los sobrenadantes producidos por las CDi y de los MΦ infectados para la subsecuente infección de CMSP activadas demuestra que estos virus re-largados por las CDi y de los MΦ infectadas son poco infectivos. Aunque no se puede excluir que esta

disminución de infectividad sea debido a la acumulación de distintos procesos: disminución de captura, disminución de liberación de las partículas en el medio extracelular de las CDi y de los MΦ infectadas y por fin disminución de la infectividad de los virus por contacto directo DEC- 2G-S16/virus. Aunque no se puede decir con certitud a qué nivel el DEC- 2G-S16 actúa para disminuir la infección de las CMSP activadas, el dendrímero tiene un efecto muy intenso sobre el poder infeccioso de las dos cepas virales, mostrando que el DEC- 2G-S16 podría ser utilizado como microbicida permitiendo la disminución de la infección de las células centinela como las CDi y MΦ, pero también de las células dianas del VIH, las CMSP. Experimentos futuros serían necesarios para aclarar el mecanismo exacto de esta inhibición viral así como para verificar si el DEC- 2G-S16 sería eficaz con otra cepa viral o con aislados primarios.

En 2009 había más de 11 candidatos a microbicidas en ensayos clínicos y más de 50 en ensayos preclínicos [242]. Sin embargo, se han descrito microbicidas que incrementan la infección por el VIH asociada al daño causado en el epitelio vaginal, como por ejemplo el nonoxinol-9 y sulfato de celulosa [36, 243]. Conocer si los dendrímeros 2G-S16 y 2G-C16 eran capaces de inducir inflamación en las células del epitelio vaginal fue un objetivo necesario para el tratamiento *in vivo* con estas moléculas. Previamente, se ha descrito que otros dendrímeros como los PAMAM+, tanto de primera como de tercera generación, son capaces de estimular citocinas proinflamatorias en ratones y en humanos [244, 245]. Este efecto provocaría una estimulación de la respuesta inmune que favorecería la infección por el VIH y podría anular los efectos antivirales observados. Los resultados de *microarrays* en monocapas de células HEC-1A expuestas durante 1 h a los DEC- 2G-C16 o 2G-S16 mostraron que no hay una inducción temprana de genes asociados a inflamación que pudieran ocasionar una mayor infectividad del virus por estimulación del sistema inmune. Sonza y col. mostraron que el dendrímero aniónico SPL7013 y la molécula polianiónica PRO2000 no aumentaron la replicación del VIH en CMSP [246], en oposición a la idea de que los microbicidas de primera generación aniónicos activaban la replicación viral [247]. Un ejemplo de un candidato a microbicida que mostró anteriormente un aumento de la producción de citocinas pro-inflamatorias en CMSP fue Cyanovirin-N [248]. No obstante, las funciones asociadas a los genes diferencialmente expresados que se obtienen en el experimento, deberán ser analizadas más en profundidad para descartar la posibilidad

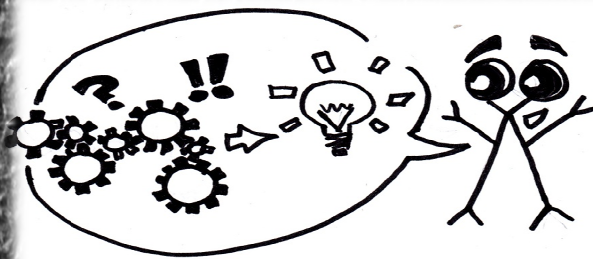
de producir efectos adversos no deseados en una posible futura aplicación farmacológica.

El primer dendrímero probado como antiviral *in vivo* fue el BRI-2999, un dendrímero de polilisina con grupos naftil sulfonato terminales [89]. El DEC- 2G-S16 se ha estudiado en un modelo vaginal de conejos hembra de la raza blanco de nueva Zelanda con el objetivo de realizar un estudio de la irritación vaginal que produce la exposición continuada del DEC- 2G-S16 a una concentración de 1 μM y 10 μM . Los datos del ensayo pre-clínico en conejos hembra fueron excelentes para la formulación de un microbicida, ya que durante dos semanas y con una aplicación diaria de dos dosis de DEC- 2G-S16 (1 μM y 10 μM), no se encontraron parámetros de irritación vaginal. No hubo mortalidad ni señales de secreción vaginal, eritema o edema en los conejos estudiados y el índice de irritación vaginal de 0,1 y 0,2 para las dosis de 1 μM y 10 μM de DEC- 2G-S16 respectivamente se calculó a partir de las observaciones microscópicas de irritación del epitelio, infiltración leucocitaria, congestión vascular y edema. El DEC- 2G-S16 presentó mejor índice de irritación vaginal que el derivado de terpeno C14, un candidato a microbicida con actividad antiviral frente a virus X4 y R5 [249]. Estos resultados pueden ampliarse en un modelo *ex-vivo* con tejido de útero humano, junto con otra serie de ensayos preclínicos.

En esta Memoria se describen dendrímeros de estructura carbosilano hidrosolubles. Precisamente la solubilidad en agua, junto con los datos que describen su biocompatibilidad y la multivalencia de superficie de estos dendrímeros (la cual aporta a estas moléculas una gran versatilidad), son datos clave para fundamentar su potencial uso biológico, abriendo la posibilidad futura de nuevas investigaciones con estos dendrímeros en campos tan diversos como la liberación controlada en el caso de los DEC+, no solamente de ODN sino también de otros fármacos polianiónicos, tales como la heparina, algunos antiinflamatorios no esteroideos como la indometacina, la aspirina, etc, buscando evitar también los efectos indeseados de la unión de estos fármacos a proteínas del plasma. Debido a su labilidad a pH ácido, podrían ser útiles para la administración de fármacos aniónicos de forma pH dependiente. Existe la posibilidad de

estudiar también estos dendrímeros para facilitar la administración por iontoforesis de dichos fármacos aniónicos, dotándolos de una carga neta positiva que facilite su paso a través de la piel al aplicarse una diferencia de potencial entre la parte externa e interna de la misma. Además, la vía transdérmica evita algunos de los efectos secundarios presentes en la administración de algunos fármacos por vías más clásicas como la oral o la parenteral (intolerancia gástrica, nefrotoxicidad). Se podría evaluar también su utilización en administración de fármacos aniónicos por vía inhalada, ya que facilitarían la adhesión a los fosfolípidos de la membrana alveolar. Sería interesante evaluar las interacciones de estos dendrímeros con proteínas anómalas tales como las presentes en la amiloidosis, o su posible papel en el diseño de vacunas, portando en su superficie péptidos antigénicos.

Por otra parte, el potencial de los DEC- reside en su capacidad anti-VIH y la posibilidad de formular un microbicida en un futuro próximo. La mostraba capacidad del DEC- 2G-S16 de inhibición de la transmisión viral a través del epitelio vaginal, unida al efecto terapéutico en CMSP infectadas, aumenta el potencial de los DEC- como posibles microbicidas. Queda por indagar el posible papel que los DEC- podrían desempeñar en la inhibición del ciclo vital de algunos patógenos (bacterias, hongos, virus e incluso priones) en base a las interacciones que pudieran establecer con componentes de membrana o proteínas de los mismos. Los resultados obtenidos permiten diseñar futuros estudios utilizando los DEC- con otros virus de transmisión sexual como el virus del herpes simple (VHS) o el virus del papiloma humano (VPH), así como el efecto en diversos patógenos como hongos y bacterias. Para poder avanzar en el desarrollo de un gel microbicida se necesita aprender de los errores de anteriores nanomoléculas estudiadas y ampliar el estudio a situaciones fisiológicas reales como por ejemplo el estudio de los DEC- en lavados cervicovaginales o en presencia de plasma seminal [250].



6. CONCLUSIONES

I. The DEC+ N8, N16, NN8 and NN16 described in this thesis were able to form effective dendriplexes with phosphorothioate ODN as well as plasmids and siRNA. Additionally, these DEC+ were seen to gradually release ODN in a time dependent manner in aqueous solution in less than 24 h. They also released ODN at pH <5.

II. The DEC+ N8, N16, NN8 and NN16 showed excellent biocompatibility profiles in PBMC, MT-2 and erythrocytes at concentrations up to 5 μ M with the DEC+ NN16 showing the best results of all. Furthermore, NN16 showed excellent biocompatibility up to 5 μ M in macrophages and primary dendritic cell cultures as well as SupT1, U87, SK-N-MC, K-562 y JEG-3.

III. The DEC+ N16, NN8 and NN16 protect ODN from interactions with human and bovine serum albumin, and NN16 appeared to offer the highest level of protection and was the best non-viral candidate for gene delivery.

IV. Stimulated PBMC were seen to greatly internalize the tested phosphorothioate ODN and the dendriplexes did not interfere with natural internalization. DEC+ NN16 dendriplex showed an improvement at inhibiting HIV replication in PBMC and MT-2 cells over the antisense ODN alone.

V. The three generations of DEC- possessing silicon cores and carboxylated or sulfonated functional groups (1G-C8, 2G-C16, 3G-C32 and 1G-S8, 2G-S16, 3G-S32, respectively) and the three generations of DEC- with polyphenolic cores and sulfonated functional groups (1G-O3S12, 2G-O3S24 y 3G-O3S48) showed excellent biocompatibility profiles in HEC-1A and PBMC up to 10 μ M.

VI. The DEC- 2G-C16 and 2G-S16 showed high inhibition of infection with HIV_{NL4-3} in HEC-1A cells with inhibition values greater than 50% and 70%, respectively, after one hour pre-treatment with the DEC- at 10 μ M.

VII. DEC- 2G-S16 showed 80% inhibition of HIV_{NL4-3} infection in PBMC when a one-hour 10 μ M pre-treatment was administered prior to HIV_{NL4-3} infection and 50% inhibition when a one-hour post-treatment was administered after HIV_{NL4-3} infection. Furthermore, 10 μ M DEC- 2G-S16 inactivated 95% of HIV-1_{NL4.3} and HIV-1_{BaL} and 50% of HIV-2_{CBL23} and SIV_{mac239} after a one-hour interaction.

VIII. DEC- 2G-S16 reduced HIV_{NL4-3} and HIV-1_{BaL} transmission across a HEC-1A monolayer by 30% and reduced HIV_{NL4-3} and HIV-1_{BaL} infection of macrophages and immature dendritic cells by 40%.

IX. A one-hour interaction of DEC- 2G-S16 at 5 µM with a HEC-1A monolayer did not result in the dysregulation of any genes related to inflammation.

X. DEC- 2G-S16 did not induce vaginal irritation in rabbits after repetitive 10 µM applications during two weeks.



Novel Water-Soluble Carbosilane Dendrimers: Synthesis and Biocompatibility

Paula Ortega,^{[a][‡]} Jesus F. Bermejo,^{[b][‡]} Louis Chonco,^[b] Ernesto de Jesus,^[a]
F. Javier de la Mata,^{*[a]} Gerónimo Fernández,^[b] Juan Carlos Flores,^[a] Rafael Gómez,^{*[a]}
M. Jesús Serramía,^[b] and M. Angeles Muñoz-Fernandez^{*[b]}

Keywords: Bioinorganic chemistry / Dendrimers / Silicon / Drug delivery / Toxicity

A synthetic strategy has been developed for the preparation of new peripheral amine- or ammonium-terminated carbosilane dendrimers of type $nG-[Si(OCH_2CH_2NMe_2)_3]_x$ or $nG-[Si(OCH_2CH_2NMe_3^+I^-)_3]_x$, respectively. It consists of the alcoholysis of well-known chlorosilane-terminated dendrimers with *N,N*-dimethylethanolamine and the subsequent quaternization with MeI. All these systems are susceptible to

hydrolysis, although the decomposition depends on concentration and dendrimer generation. Evaluation of dendrimer toxicities by phase-contrast light microscopy and MTT assay were carried out, and evidence of dendrimer/oligonucleotide complex formation was carried out by gel electrophoresis. (© Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, Germany, 2006)

Introduction

There is currently significant interest in dendrimers as a result of their potential applications, including light harvesting and energy transfer, nanoscale catalysis, chemical sensors, unimolecular micelles, enzyme mimics, encapsulation of guest molecules, molecular recognition, diagnostic agents, and gene and drug delivery.^[1]

The two common drug delivery systems are liposomes and polymers, although both present some problems.^[2] Liposome-based systems have poor stability, difficulty targeting specific tissues, side effects like lung-inflammatory reactions, and in transfection, processes may fail in the presence of serum. The main drawbacks of the use of conventional degradable polymers as delivery agents are their polydispersity and thermodynamic instability that result in a short in vivo lifetime of the active species. Dendrimers represent an alternative approach to liposomes and polymeric systems for drug delivery. Their major advantages are the uniform structure, multiple sites of attachment, and the versatility to modify their skeletons and surfaces, allowing a precise characterization of the dendrimer/drug interaction. There are two general methods for the use of dendrimers as drug carriers, that is (i) encapsulation of drugs inside the

dendritic skeleton^[3] or (ii) formation of dendrimer-drug conjugates in which the drug is attached preferentially to its surface. For the latter method, two methodologies have been developed. The first technique consists of a covalent link between peripheral units of the dendrimer and the drug. For instance, methotrexate or folic acid have been attached to the exterior of polyarylether^[4] dendrimers or conjugated in poly(amidoimine) (PAMAM)^[5] dendrimers. The second approach is based on electrostatic interactions and has been mainly focused on the delivery of DNA drugs into the cell nucleus for gene or antisense therapy. Numerous reports have been published on the use of amino-terminated PAMAM dendrimers,^[6] phosphorus-based dendrimers,^[7] polypropylenimine (PPI)^[8] or poly(lysine)^[9] dendrimers as nonviral gene-transfer agents.

However, to the best of our knowledge, no studies concerning the use of water-soluble carbosilane-based dendrimers as potential drug carriers have been published, although an in vitro biocompatibility report was recently published on poly(ethylene oxide)-grafted carbosilane dendrimers.^[10] Besides, a scarce number of polyionic silane dendrimers have been reported so far.^[11–13]

Here we describe the synthesis and characterization of novel water-soluble carbosilane dendrimers up to the third generation, and the analysis of their biocompatibility in primary cell cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

Results and Discussion

Amine-Terminated Carbosilane Dendrimers

We have studied the synthesis of dendrimers containing peripheral amine groups. For this purpose, first-, second-,

[a] Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá, Campus Universitario, 28871 Alcalá de Henares, Spain
Fax: +34-91-8854683
E-mail: Rafael.Gomez@uah.es

[b] Laboratorio de Inmunobiología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

[‡] Paula Ortega and Jesus F. Bermejo contributed equally to the development of this work.

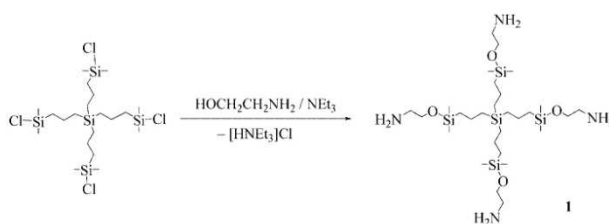
□ Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.eurjic.org> or from the author.

and third-generation chlorosilane-terminated dendrimers were synthesized as previously reported.^[14] Typically, we used tetraallylsilane or other allylsilane-terminated dendrimers as the initiator core and chlorodimethylsilane or dichloromethylsilane for the hydrosilylation step in the presence of a platinum catalyst (Karstedt catalyst),^[15] to afford the well-known Cl-Si-terminated dendrimers 1G-(SiCl)₄, 1G-(SiCl₂)₄, 2G-(SiCl)₈, 2G-(SiCl₂)₈, 3G-(SiCl)₁₆, and 3G-(SiCl₂)₁₆. These formed the starting materials for the preparation of new dendrimers by alcoholysis reactions.

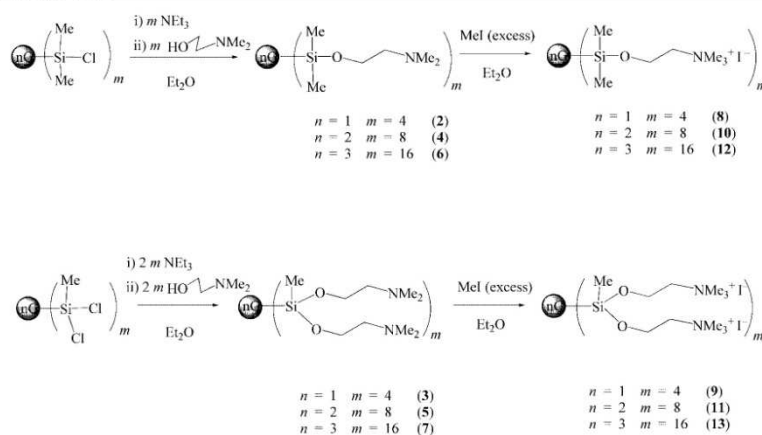
Treatment of dendrimer 1G-(SiCl)₄ with 4 equiv. of ethanolamine at room temperature in diethyl ether and in the presence of NEt₃ led to the formation of the corresponding amine-terminated dendrimer 1G-[Si(OCH₂CH₂NH₂)₄] (1), which was isolated as a brown oil after separation from the precipitated ammonium salt [HNEt₃]Cl and evaporation of the solvent (Scheme 1). In the absence of NEt₃, the dendrimer precipitated as a white solid material that we initially assigned to the self-quaternization of the amine groups in 1 because addition of NEt₃ to this white material in DMSO dissolved it to afford 1 again as the sole spectroscopic compound. However, when we tried to dissolve this material in water, an insoluble residue of polysiloxanes and the soluble ammonium salt of ethanolamine were separated. The data of the ¹H NMR spectrum performed in D₂O are consistent with the hydrolysis of the Si-O bonds under these slight acidic conditions. Derivative 1 exhibits a multiplet in the ¹H NMR spectrum located at δ = 1.32 ppm, attributed to the middle methylene group of the branch -SiCH₂CH₂CH₂Si-, and the two signals at δ = 0.63 and 0.53 ppm are assigned to the methylene groups directly bonded to silicon. The outer branch gives two triplets at δ = 3.55 and 2.74 ppm, corresponding to -CH₂O- and -CH₂N-. The ¹³C NMR spectroscopic data are consistent with this assignment. Water-solubilization of dendrimer 1 was attempted by quaternization of the terminal amine groups. Reaction of 1 with a diethyl ether solution of HCl produced the hydrolytic breaking of the Si-O bonds, in accordance with the reactivity mentioned earlier. The attempt to quaternize derivative 1 using MeI also failed because of the hydrolysis of the Si-O bonds caused by the HI generated by Me/I exchanges with the amine protons.^[16]

To overcome these problems, chlorosilane-terminated dendrimers were treated with stoichiometric amounts of *N,N*-dimethylethanolamine in diethyl ether and in the presence of stoichiometric NEt₃, to afford the corresponding amine-terminated dendrimers 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₄] (2), 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₄ (3), 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₈] (4), 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₈ (5), 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₁₆] (6), and 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₁₆ (7) as brown oils in high yields (Scheme 2). All these derivatives are soluble in common organic solvents, but are insoluble in water.

The NMR spectroscopic and analytical data for derivatives 2–7 are consistent with their proposed structures (Scheme 2). The ¹H NMR spectra of the carbosilane framework for dendrimers 2–7 have almost identical chemical shifts for analogous nuclei in different generations, although broader and less structured resonances are present with increasing generation. These features have been ascribed to both a polymer-like structure with slightly different chemical environments for the nuclei in different generations and restricted mobility of the respective protons in the outer shells.^[17,18] Five sets of signals attributed to the methylene groups are observed with the expected integration ratio. For the SiCH₂CH₂CH₂Si branches, the middle methylenes are located at δ = 1.30 ppm, whilst the methylene groups bonded directly to silicon atoms are centered at δ = 0.61 and 0.51 ppm. We ascribed the resonances at δ = 0.61 ppm to the -CH₂SiO- groups and those at δ = 0.51 ppm to the rest of the methylene groups, based on the enlargement of the latter signal intensity with increasing dendrimer generation, and also on 1D ¹H TOCSY and NOESY experiments. Two triplets are observed for the SiOCH₂CH₂N fragment, located at δ = 3.64 (for dendrimers 2, 4, and 6) or 3.74 ppm (for dendrimers 3, 5, and 7) attributed to the -CH₂O- groups, and δ = 2.43 ppm for the -CH₂N- groups; this observation is supported by data from NOESY experiments. Interestingly, the downfield shifts shown by dendrimers 3, 5, and 7 are consistent with the presence of two oxygen atoms bonded to the silicon atom, although this effect is negligible for the -CH₂N- groups. The ¹³C NMR spectra for the methylene groups show two resonances located at δ = 61.4 (-CH₂N-) and 60.7 ppm (-CH₂O-) for the outer



Scheme 1.



Scheme 2.

SiOCH₂CH₂N branches, and for the inner SiCH₂CH₂CH₂Si branches, signals in the range of $\delta = 21.3$ to 17.4 ppm are observed. HMQC experiments were required to locate their resonances. For the N-Me groups, the signals in the ¹H- and ¹³C NMR spectra show unchanged resonances at $\delta = 2.23$ and 46.1 ppm, respectively. Both the -SiMe₂- and -SiMe- fragments can be easily distinguished in all derivatives and generations (see Exp. Sect.). It is worth noting that for the outer -SiMe- groups the resonance appears about $\delta = -1.7$ ppm in dendrimers **2**, **4**, and **6**, whilst it is located around $\delta = -4.4$ ppm for dendrimers **3**, **5**, and **7**, as a consequence, again, of the presence of one or two silicon-bonded oxygen atoms, respectively. This feature is clearly observed in the ²⁹Si NMR spectra, although the innermost silicon atom is only detected for the first generations.

Dendrimers were also analyzed by mass spectroscopy (electrospray or MALDI-TOF MS) using 1,8,9-trihydroxyanthracene (dithranol) as a matrix. However, the molecular peaks were not observed for the second and third generations, as described for many high-molecular-weight dendrimers.^[19]

Ammonium-Terminated Carbosilane Dendrimers

Attempts to quaternize the amine-terminated carbosilane dendrimers **2–7** with stoichiometric amounts or an excess of HCl failed because of hydrolysis of the Si-O bonds. However, treatment of the dendrimers with an excess of MeI in diethyl ether led to quantitative quaternization of the amine groups within 24–48 h, causing the precipitation of the ammonium iodide salts 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I)]₄

(**8**), 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I)]₄ (**9**), 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I)]₈ (**10**), 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I)]₈ (**11**), 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I)]₁₆ (**12**), and 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I)]₁₆ (**13**) in high yields as white hygroscopic solids (Scheme 2). In the case of the amine-terminated dendrimer **7**, some dimethylamine groups remained unquaternized. The ¹H NMR spectrum revealed that roughly 29 of the 32 amine groups were quaternized, even if we used a large excess of MeI and prolonged reaction times. All the dendritic ionic derivatives are insoluble in normal organic solvents, but are soluble in DMSO, MeOH, and H₂O, although slow decomposition occurs in protic solvents (see later for decomposition behavior).

The NMR spectroscopic and analytical data of derivatives **8–13** are consistent with their proposed structures (Scheme 2 and Figure 1). The ¹H NMR spectra were recorded in DMSO at room temperature, although in this solvent the line widths of these spectra tended to be broader than those of derivatives soluble in common organic solvents. The ¹H- and ¹³C NMR spectra of the quaternized dendrimers **8–13** exhibit identical resonance patterns to those observed in their counterparts **2–7** for the carbosilane framework, although broader signals are seen with increasing generation (see Exp. Sect. and Supporting Information). Two broad multiplets are observed for the outer Si-OCH₂CH₂N grouping, centered at $\delta = 3.94$ (for dendrimers **8**, **10**, and **12**) or 4.12 ppm (for dendrimers **9**, **11**, and **13**) for the -CH₂O- groups, and $\delta = 3.45$ (for dendrimers **8**, **10**, and **12**) or 3.56 ppm (for dendrimers **9**, **11**, and **13**) for the -CH₂N- fragment. The quaternization of the amine groups resulted in a deshielding of the chemical shifts of the -CH₂O- groups by 0.3–0.4 ppm, whereas for the -CH₂N-

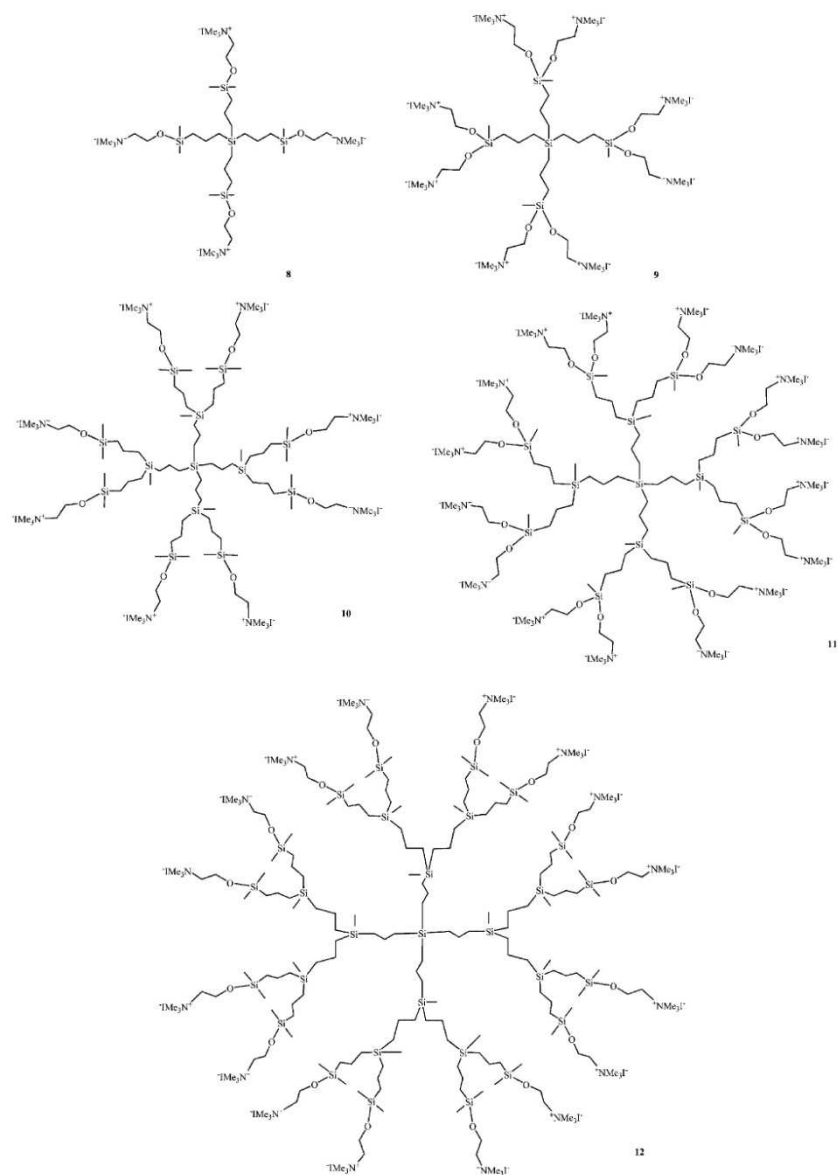


Figure 1. Molecular representations of the ammonium-terminated carbosilane dendrimers 8–12.

methylene groups this shift was about 1 ppm, consistent with the presence of a positive charge on the nitrogen atom. Analogous shifts are observed for the carbon atoms in their ^{13}C NMR spectra. This behavior is also detected in the methyl groups, which appear in the ^1H - and ^{13}C NMR spectra centered at $\delta = 3.18$ and 52.6 ppm, respectively, downfield of those observed in the amine-terminated dendrimers 2–7.

Hydrolysis Behavior of Amine- and Ammonium-Terminated Dendrimers

As mentioned earlier, the amine-terminated dendrimers and the quaternized derivatives decompose in protic solvents. For instance, when dendrimers 3 or 9 are dissolved in methanol for several hours, after extraction with diethyl ether, a new dendrimer is formed, $1\text{G}[\text{Si}(\text{OMe})_2]_4$, consistent with the alcoholysis of the Si–O bonds, the inclusion of methoxy groups,^[20] and the respective formation of ethanolamine or its ammonium salt.

The hydrolysis of the second- and third-generation ammonium-terminated dendrimers 10 and 12 was studied in more detail. Both dendrimers degrade in deuterated water to form $[\text{DOCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+\text{I}^-]$ and an insoluble polymeric carbosiloxane material. The changes in dendrimer concentration were measured by ^1H NMR spectroscopy on the basis of the integration of both $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ methylene proton resonances, which were always at $\text{pD} = 7.2$. A plot of $\ln[\text{dendrimer}]$ versus time showed an apparently first-order decomposition (see Figure 2). However, when the plot was performed using different initial dendrimer concentrations (see Supporting Information) the results showed that the rate constant decreases with increasing dendrimer concentration. The same decrease is observed on going from the second to the third generation when the hydrolytic processes were carried out at the same pD and initial concentrations in $[\text{Si}-\text{O}]$ bonds, suggesting the existence of a dendritic effect (Figure 2). A plausible explanation for all these features may be the presence of interactions between branches in a cooperative effect that may decrease the rate of the process, making the decomposition a result of complex behavior.

Evaluation of Dendrimer Toxicity

Quaternized second-generation carbosilane dendrimers 10 and 11 were tested on a primary cell culture of PBMCs (from healthy donors) as an initial screen for biocompatibility. Dendrimers of first generation were too water-sensitive for toxicity evaluation, while those of third generation were not tested because of solubility problems. As a primary cell culture, PBMCs are more sensitive to external challenge than immortalized cell lines; thus, they are good models in which to perform toxicity studies. Furthermore, there are a number of diseases that affect these cells (for example leukemia, viral infections such as HIV or HTLV, genetic disorders such as Severe Combined Immunodeficiency (SCID), and so on), and they are also a major target for immunomodulation. Additionally, PBMCs placed in the bloodstream are easily accessible to systemic drugs. In order to evaluate the range of biocompatibility of dendrimers 10 and 11, PBMCs were incubated for 48 h with increased concentrations of free dendrimer (1, 5, 10, 20, and 100 μM). Untreated cells were used as a control for viability. After this period of incubation, cells were observed under a phase-contrast light microscope. In parallel, mitochondrial activity (MA) of cells challenged with dendrimers was evaluated by MTT test and compared with that shown by the control cells. MTT results demonstrated a similar MA in cells treated with both second-generation dendrimers 10 and 11 at the different concentrations tested (Figure 3). At the concentration of 1 μM , MA was around 80% of that shown by the control, while at 5 μM , MA decreased to 30%. Observation of cells under phase-contrast light microscopy showed that cells treated with concentrations from 1 to 5 μM of the dendrimers were alive, with no visible differences from control cells. Cells treated with concentrations of 10 μM or higher exhibited reduced membrane birefringence and a concentration-dependent increase in mortality, and even more, at these concentrations, formation of cell aggregates was observed with dendrimer 11, probably caused by the presence of a higher cationic charge on its surface (not only dendrimers, but cationic macromolecules in general cause destabilization of the cell membrane).^[13–21] Overall, the results from the MTT test and the microscopic observa-

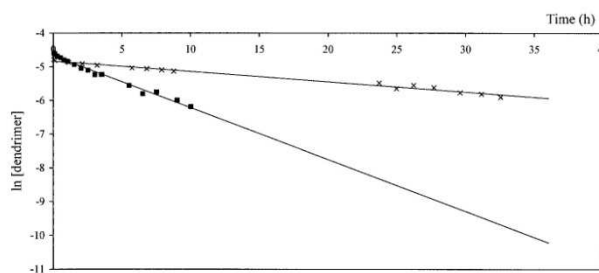


Figure 2. Plot of the hydrolysis process of the ammonium-terminated carbosilane dendrimers of second generation 10 (filled squares) and third generation 12 (crosses), at the same initial concentration.

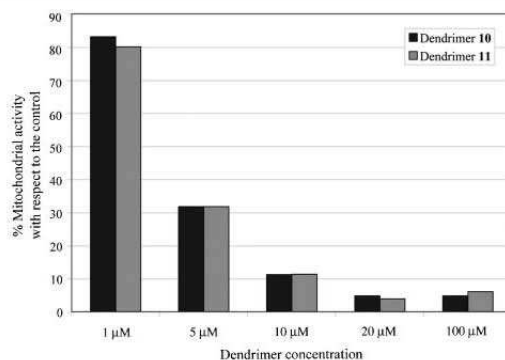


Figure 3. Quantification of mitochondrial activity of cells by MTT test after 48 h of incubation with different concentrations of the carbosilane dendrimers **10** and **11**.

tions lead to the conclusion that the biocompatible concentrations for both dendrimers are between 1 and 5 μM .

A preliminary study of the capacity of these dendrimers in the complexation with the nucleic material to give the so-called dendriplexes was performed by electrophoretic analysis. The technique was carried out in agarose gel using dendrimer **10** and a fluoresceinated phosphorothioate oligodeoxynucleotide (ODN) at different electrostatic charge ratios (+)/(-) (see Figure 4). The retardation of the ODN migration observed in the gel electrophoresis indicates that the ODN is associated with the dendrimer demonstrating a successful complex formation, even at 2:1 charge ratio in which the dendrimer concentration is in the range of biocompatibility mentioned earlier. Because of the hydrolytic problems shown by the carbosilane dendrimers with Si-O bonds, an experiment was performed to ensure that the quaternized dendrimers are responsible for the ODN retardation, rather than charged terminal functional groups detached from the dendritic structure. To this end, mixtures of ODN with the terminal groups $[\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+\text{T}^-]$ alone were sub-

jected to electrophoresis and retardation of the ODN assessed (see also Figure 4). The results clearly show that the terminal branches alone were not able to retard ODN migration, indicating that the whole functionalized dendrimer was necessary to form complexes with ODN. The dendriplexes released the ODN progressively between 6–24 h, which is adequate time for some biomedical applications.

Conclusion

A synthetic strategy has been developed for the preparation of new peripheral amine- or ammonium-terminated carbosilane dendrimers. It consists of the alcoholysis of well-known chlorosilane-terminated dendrimers with *N,N*-dimethylethanolamine and the subsequent quaternization reaction with MeI. This procedure was shown to be suitable for the growth of high generations, although partial quaternization was observed in the more crowded third-generation dendrimer **7**. Evaluation of dendrimer toxicity by phase-contrast light microscopy and MTT assay revealed that the second-generation dendrimers **10** and **11** show good toxicity profiles in primary cell culture models over extended periods for concentrations between 1 and 5 μM , making them attractive for potential use as biocompatible drug carriers. All these systems are sensitive towards hydrolysis by breaking of the Si-O bonds with the subsequent liberation of their peripheral units. This feature may have a detrimental effect on the dendrimer properties, however, such a process could be useful in the design of carriers for controlled release of drugs. In addition, the capacity of dendrimer/oligonucleotide complex formation was confirmed by electrophoresis. These experiments open the way to use these dendritic macromolecules as drug delivery systems by an electrostatic approach and their posterior release by means of the hydrolytic process. Further studies are in progress to modify the external ammonium motif of the carbosilane dendrimers in order to control their stability towards hydrolysis.



Figure 4. Electrophoresis of dendrimer **10** or $[\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+\text{T}^-]$ and ODN on a 3% agarose gel: (1) a 100 bp DNA ladder as reference; (2) **10**/ODN ratio (+)/(-), 2:1; (3) **10**/ODN ratio (+)/(-), 4:1; (4) **10**/ODN ratio (+)/(-), 20:1; (5) **10**/ODN ratio (+)/(-), 40:1; (6) ODN only; (7) $[\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+\text{T}^-]$ /ODN ratio (+)/(-), 2:1; (8) $[\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+\text{T}^-]$ /ODN ratio (+)/(-), 4:1; (9) $[\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+\text{T}^-]$ /ODN ratio (+)/(-), 20:1; (10) $[\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+\text{T}^-]$ /ODN ratio (+)/(-), 40:1; (11) ODN only.

Experimental Section

General: All manipulations of oxygen- or water-sensitive compounds were carried out under argon using standard Schlenk techniques or an argon-filled glovebox. Solvents were dried and freshly distilled under argon prior to use: hexane from sodium-potassium, toluene from sodium, tetrahydrofuran and diethyl ether from sodium benzophenone ketyl, and dichloromethane from P_2O_{10} . Unless otherwise stated, reagents were obtained from commercial sources and used as received. $nG-(SiCl_2)_x$ dendrimers were prepared according to reported methods.^[14]

1H -, ^{13}C -, and ^{29}Si NMR spectra were recorded with Varian Unity VXR-300 and Varian 500 Plus Instruments. Chemical shifts (δ , ppm) were measured relative to residual 1H and ^{13}C resonances for $[D_3]chloroform$ and $[D_2]dimethyl sulfoxide$ which were used as solvents, and ^{29}Si chemical shifts were referenced to external $SiMe_4$ ($\delta = 0.00$ ppm). The integral values of the signals in the 1H NMR spectra of dendrimer complexes represent only 25% of the total amount of hydrogen atoms. C, H, and N analyses were carried out with a Perkin–Elmer 240 C microanalyzer. MALDI-TOF MS samples were prepared in a 1,8,9-trihydroxyanthracene (dithranol) matrix, and spectra were recorded with a Bruker Reflex II spectrometer equipped with a nitrogen laser emitting at 337 nm and operated in the reflector mode at an accelerating voltage in the range 23000–25000 V.

Synthesis of 1G-[Si(OCH₂CH₂NH₂)₂]₄ (1): To a diethyl ether solution (50 mL) of the first-generation chloro-terminated dendrimer 1G-(SiCl)₄ (0.35 g, 0.61 mmol) were added a slight excess of NEt_3 (0.40 mL, 2.86 mmol) and ethanolamine (0.16 mL, 2.44 mmol). The reaction mixture was stirred for 12 h at room temp. and then evaporated to dryness to remove residual NEt_3 . The residue was extracted with Et_2O (50 mL) and filtered through Celite to remove the ammonium salt $NEt_3 \cdot HCl$. The resulting solution was evaporated under reduced pressure to give 1 as a brown oil (0.21 g, 51%). 1H NMR ($CDCl_3$): $\delta = 3.55$ (t, 2 H, CH_2O), 2.74 (t, 2 H, CH_2N), 1.46 (s, 2 H, NH_2), 1.32 (m, 2 H, $SiCH_2CH_2CH_2SiO$), 0.63 (m, 2 H, CH_2SiO), 0.53 (m, 2 H, CH_2Si), 0.07 (s, 6 H, $OSiMe_2$) ppm. $^{13}C\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): $\delta = 64.8$ (CH_2N), 44.3 (CH_2O), 21.3 (CH_2SiO), 17.9, 17.2 ($SiCH_2CH_2CH_2SiO$), -1.9 ($OSiMe_2$) ppm. $C_{28}H_{72}N_4O_4Si_5$ (668.4): calcd. C 50.27, H 10.77, N 8.38; found C 51.01, H 11.03, N 8.06.

Synthesis of 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₄ (2): To a diethyl ether (40 mL) solution of the first-generation chloro-terminated dendrimer 1G-(SiCl)₄ (0.85 g, 1.49 mmol) were added a slight excess of NEt_3 (0.86 mL, 6.2 mmol) and N,N -dimethylethanolamine (0.6 mL, 5.97 mmol). The reaction mixture was stirred for 1 h at room temp. and then evaporated to dryness to remove residual NEt_3 . The residue was extracted with Et_2O (30 mL) and filtered through Celite to remove the ammonium salt $NEt_3 \cdot HCl$. The resulting solution was evaporated under reduced pressure to give 2 as a pale yellow oil (0.98 g, 84%). 1H NMR ($CDCl_3$): $\delta = 3.64$ (t, 2 H, CH_2O), 2.40 (t, 2 H, CH_2N), 2.22 (s, 6 H, NMe_2), 1.31 (m, 2 H, $SiCH_2CH_2CH_2SiO$), 0.60 (m, 2 H, CH_2SiO), 0.53 (m, 2 H, CH_2Si), 0.07 (s, 6 H, $OSiMe_2$) ppm. $^{13}C\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): $\delta = 61.5$ (CH_2N), 60.8 (CH_2O), 46.1 (NMe_2), 21.3 (CH_2SiO), 18.1, 17.4 ($SiCH_2CH_2CH_2SiO$), -1.7 ($OSiMe_2$) ppm. $^{29}Si\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): $\delta = 0.49$ (G_0-Si), 17.62 (G_1-Si) ppm. $C_{36}H_{88}N_4O_4Si_5$ (780.4): calcd. C 55.36, H 11.28, N 7.17; found C 55.16, H 11.22, N 7.06.

Synthesis of 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₄ (3): This dendrimer was prepared using a similar method to that described for 2, starting from 1G-(SiCl)₂ (0.54 g, 0.87 mmol), N,N -dimethylethanolamine

(0.7 mL, 6.94 mmol), and NEt_3 (1.0 mL, 7.2 mmol) to obtain compound 3 as a colorless oil (0.75 g, 80%). 1H NMR ($CDCl_3$): $\delta = 3.74$ (t, 4 H, CH_2O), 2.43 (t, 4 H, CH_2N), 2.23 (s, 12 H, NMe_2), 1.31 (m, 2 H, $SiCH_2CH_2CH_2SiO$), 0.63 (m, 2 H, CH_2SiO), 0.52 (m, 2 H, CH_2Si), 0.09 (s, 3 H, $OSiMe$) ppm. $^{13}C\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): $\delta = 61.4$ (CH_2N), 60.7 (CH_2O), 46.2 (NMe_2), 18.7 (CH_2SiO), 17.7, 17.2 ($SiCH_2CH_2CH_2SiO$), -4.4 ($OSiMe$) ppm. $^{29}Si\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): $\delta = 0.47$ (G_0-Si), -3.65 (G_1-Si) ppm. $C_{48}H_{116}N_8O_8Si_5$ (1072.4): calcd. C 53.71, H 10.82, N 10.44; found C 53.54, H 11.33, N 10.06. MALDI-TOF MS: m/z 1095.8 [$M + H$]⁺ (calcd. 1095.8).

Synthesis of 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₈ (4): This dendrimer was prepared using a similar method to that described for 2, starting from 2G-(SiCl)₈ (0.27 g, 0.18 mmol), N,N -dimethylethanolamine (0.15 mL, 1.47 mmol), and NEt_3 (0.25 mL, 1.79 mmol) to obtain compound 4 as a pale yellow oil (0.31 g, 90%). 1H NMR ($CDCl_3$): $\delta = 3.64$ (t, 4 H, CH_2O), 2.41 (t, 4 H, CH_2N), 2.23 (s, 12 H, NMe_2), 1.30 (m, 6 H, $SiCH_2CH_2CH_2SiO$ and $SiCH_2CH_2CH_2Si$ overlapping), 0.65 (m, 4 H, CH_2SiO), 0.53 (m, 8 H, rest of CH_2Si), 0.07 (s, 12 H, $OSiMe_2$), -0.09 (s, 3 H, $SiMe$) ppm. $^{13}C\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): $\delta = 61.5$ (CH_2N), 60.8 (CH_2O), 46.1 (NMe_2), 21.1 (CH_2SiO), 18.6, 17.9 and overlapped signals ($SiCH_2CH_2CH_2SiO$ and $SiCH_2CH_2CH_2Si$ overlapping), -1.9 ($OSiMe_2$), -4.9 ($SiMe$) ppm. $^{29}Si\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): $\delta = 0.93$ (G_1-Si), 17.60 (G_2-Si) ppm, G_0-Si was not observed. $C_{88}H_{212}N_{16}O_{16}Si_{13}$ (1873.0): calcd. C 56.38, H 11.32, N 5.98; found C 55.98, H 11.20, N 5.78.

Synthesis of 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₈ (5): This dendrimer was prepared using a similar method to that described for 2, starting from 2G-(SiCl)₈ (0.48 g, 0.30 mmol), N,N -dimethylethanolamine (0.48 mL, 4.77 mmol), and NEt_3 (0.7 mL, 5.02 mmol) to obtain compound 5 as a colorless oil (0.66 g, 90%). 1H NMR ($CDCl_3$): $\delta = 3.75$ (t, 8 H, CH_2O), 2.44 (t, 8 H, CH_2N), 2.24 (s, 24 H, NMe_2), 1.34 (m, 6 H, $SiCH_2CH_2CH_2SiO$ and $SiCH_2CH_2CH_2Si$ overlapping), 0.64 (m, 4 H, CH_2SiO), 0.51 (m, 8 H, rest of CH_2Si), 0.09 (s, 6 H, $OSiMe$), -0.10 (s, 3 H, $SiMe$) ppm. $^{13}C\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): $\delta = 61.4$ (CH_2N), 60.7 (CH_2O), 46.2 (NMe_2), 18.6 (CH_2SiO), 17.7, 17.0 and overlapped signals ($SiCH_2CH_2CH_2SiO$ and $SiCH_2CH_2CH_2Si$ overlapping), -4.4 ($OSiMe$), -4.8 ($SiMe$) ppm. $^{29}Si\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): $\delta = 0.92$ (G_1-Si), -3.54 (G_2-Si) ppm, G_0-Si was not observed. $C_{112}H_{268}N_{16}O_{16}Si_{13}$ (2457.0): calcd. C 54.70, H 10.91, N 9.12; found C 54.20, H 11.20, N 9.59.

Synthesis of 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₁₆ (6): This dendrimer was prepared using a similar method to that described for 2, starting from 3G-(SiCl)₁₆ (0.20 g, 0.06 mmol), N,N -dimethylethanolamine (0.10 mL, 0.99 mmol), and NEt_3 (0.16 mL, 1.14 mmol) to obtain compound 6 as a pale yellow oil (0.18 g, 74%). 1H NMR ($CDCl_3$): $\delta = 3.65$ (t, 8 H, CH_2O), 2.42 (t, 8 H, CH_2N), 2.24 (s, 24 H, NMe_2), 1.23 (m, 14 H, $SiCH_2CH_2CH_2SiO$ and $SiCH_2CH_2CH_2Si$ overlapping), 0.64 (m, 8 H, CH_2SiO), 0.53 (m, 20 H, rest of CH_2Si), 0.07 (s, 24 H, $OSiMe_2$), -0.10 (s, 9 H, $SiMe$) ppm. $^{13}C\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): $\delta = 61.5$ (CH_2N), 60.8 (CH_2O), 46.1 (NMe_2), 21.1 (CH_2SiO), 18.6, 17.9 and overlapped signals ($SiCH_2CH_2CH_2SiO$ and $SiCH_2CH_2CH_2Si$ overlapping), -1.8 ($OSiMe_2$), -4.8 ($SiMe$) ppm. $^{29}Si\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$): $\delta = 0.95$ (G_2-Si), 17.95 (G_3-Si) ppm, G_0-Si and G_1-Si were not observed. $C_{192}H_{480}N_{16}O_{16}Si_{29}$ (4058.3): calcd. C 56.77, H 11.33, N 5.52; found C 56.17, H 11.28, N 5.34.

Synthesis of 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₂)₂]₁₆ (7): This dendrimer was prepared using a similar method to that described for 2, starting from 3G-(SiCl)₁₆ (0.19 g, 0.05 mmol), N,N -dimethylethanolamine (0.17 mL, 1.68 mmol), and NEt_3 (0.24 mL, 1.79 mmol) to obtain compound 7 as a pale yellow oil (0.20 g, 72%). 1H NMR ($CDCl_3$): $\delta = 3.75$ (t, 16 H, CH_2O), 2.44 (t, 16 H, CH_2N), 2.24 (s, 48 H, NMe_2), 1.32 (m, 14 H, $SiCH_2CH_2CH_2SiO$), 0.66 (m, 8 H,

$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$, 0.53 (m, 20 H, rest of SiCH_2), 0.07 (s, 12 H, OSiMe), -0.10 (s, 9 H, SiMe) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3): $\delta = 61.4$ (CH_2N), 60.7 (CH_2O), 46.1 (NMe_2), a range 18.4–17.4 and overlapped signals ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$ and $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ overlapping), -4.7 (OSiMe_2), -5.2 (SiMe) ppm. $\text{C}_{240}\text{H}_{572}\text{N}_{32}\text{O}_{32}\text{Si}_{29}$ (5226.3): calcd. C 55.11, H 10.95, N 8.57; found C 56.11, H 11.89, N 8.13.

Synthesis of 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺T)]₄ (8): To a diethyl ether (10 mL) solution of **2** (0.12 g, 0.15 mmol) was added a MeI solution (0.4 mL, 0.8 mmol, 2 M in Et₂O). The resulting solution was stirred for 48 h at room temp. and then evaporated under reduced pressure to remove residual MeI. The residue was washed with Et₂O (2 × 5 mL) and dried under vacuum to give **8** as a white solid (0.20 g, 96%). ^1H NMR (DMSO): $\delta = 3.94$ (m, 2 H, CH_2O), 3.43 (m, 2 H, CH_2N), 3.09 (s, 9 H, NMe_3^+), 1.29 (m, 2 H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0.66 (m, 2 H, CH_2SiO), 0.56 (m, 2 H, CH_2Si), 0.11 (s, 6 H, OSiMe_2) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (DMSO): $\delta = 65.8$ (CH_2N), 55.8 (CH_2O), 52.6 (NMe_3^+), 19.7 (CH_2SiO), 16.9, 16.1 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), -2.6 (OSiMe_2) ppm. $\text{C}_{40}\text{H}_{100}\text{I}_4\text{N}_4\text{O}_4\text{Si}_5$ (1348.0): calcd. C 35.61, H 7.42, N 4.15; found C 36.67, H 7.65, N 4.42.

Synthesis of 1G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺T)]₄ (9): This first-generation dendrimer was prepared using a similar method to that described for **8**, starting from **3** (0.17 g, 0.16 mmol) and a MeI solution (0.80 mL, 1.6 mmol, 2 M in Et₂O). Compound **9** was isolated as a white solid (0.29 g, 86%). ^1H NMR (DMSO): $\delta = 4.12$ (m, 4 H, CH_2O), 3.54 (m, 4 H, CH_2N), 3.17 (s, 18 H, NMe_3^+), 1.29 (m, 2 H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0.75 (m, 2 H, CH_2SiO), 0.54 (m, 2 H, CH_2Si), 0.20 (s, 3 H, OSiMe) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (DMSO): $\delta = 65.8$ (CH_2N), 56.0 (CH_2O), 52.7 (NMe_3^+), 17.3 (CH_2SiO), 16.5, 15.9 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), -5.3 (OSiMe) ppm. $\text{C}_{56}\text{H}_{140}\text{I}_8\text{N}_8\text{O}_8\text{Si}_5$ (2207.6): calcd. C 30.44, H 6.34, N 5.07; found C 31.47, H 6.47, N 5.19.

Synthesis of 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺T)]₈ (10): This dendrimer was prepared using a similar method to that described for **8**, starting from **4** (0.25 g, 0.13 mmol) and a MeI solution (0.6 mL, 1.2 mmol, 2 M in Et₂O). Compound **10** was isolated as a white solid (0.35 g, 87%). ^1H NMR (DMSO): $\delta = 3.96$ (m, 4 H, CH_2O), 3.45 (m, 4 H, CH_2N), 3.11 (s, 18 H, NMe_3^+), 1.29 (m, 6 H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$ and $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.65 (m, 4 H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0.52 (m, 8 H, rest of SiCH_2), 0.11 (s, 12 H, OSiMe_2), -0.10 (s, 3 H, SiMe) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (DMSO): $\delta = 65.7$ (CH_2N), 55.9 (CH_2O), 52.6 (NMe_3^+), 19.7, 17.5, 16.9 and overlapped signals ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$ and $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), -2.5 (OSiMe_2), -5.3 (SiMe) ppm. $\text{C}_{96}\text{H}_{236}\text{I}_8\text{N}_8\text{O}_8\text{Si}_{13}$ (3008.2): calcd. C 38.29, H 7.85, N 3.72; found C 38.87, H 8.32, N 3.79.

Synthesis of 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺T)]₈ (11): This dendrimer was prepared using a similar method to that described for **8**, starting from **5** (0.10 g, 0.04 mmol) and a MeI solution (0.5 mL, 1.0 mmol, 2 M in Et₂O). Compound **11** was isolated as a white solid (0.17 g, 87%). ^1H NMR (DMSO): $\delta = 4.13$ (m, 8 H, CH_2O), 3.56 (m, 8 H, CH_2N), 3.19 (s, 36 H, NMe_3^+), 1.28 (m, 6 H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$ and $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.72 (m, 4 H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0.55 (m, 8 H, rest of SiCH_2), 0.21 (s, 6 H, OSiMe_2), -0.08 (s, 3 H, SiMe) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (DMSO): $\delta = 65.7$ (CH_2N), 56.0 (CH_2O), 52.7 (NMe_3^+), 19.2, 17.2, 16.4 and overlapped signals ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$ and $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), -5.2 (OSiMe_2), -5.6 (SiMe) ppm. $\text{C}_{128}\text{H}_{316}\text{I}_{16}\text{N}_{16}\text{O}_{16}\text{Si}_{13}$ (4727.4): calcd. C 32.49, H 6.68, N 4.74; found C 33.32, H 7.03, N 4.72.

Synthesis of 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺T)]₁₆ (12): This dendrimer was prepared using a similar method to that described for **8**, starting from **6** (0.12 g, 0.03 mmol) and a MeI solution (0.4 mL,

0.8 mmol, 2 M in Et₂O). Compound **12** was isolated as a white solid (0.16 g, 83%). ^1H NMR (DMSO): $\delta = 3.96$ (m, 8 H, CH_2O), 3.47 (m, 8 H, CH_2N), 3.13 (s, 36 H, NMe_3^+), 1.28 (m, 14 H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$ and $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.65 (m, 8 H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0.52 (m, 20 H, rest of SiCH_2), 0.10 (s, 24 H, OSiMe_2), -0.08 (s, 9 H, SiMe) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (DMSO): $\delta = 65.8$ (CH_2N), 55.9 (CH_2O), 52.6 (NMe_3^+), 19.7, 17.2, 16.0 and overlapped signals ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$ and $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), -2.7 (OSiMe_2), -5.5 (SiMe) ppm. $\text{C}_{208}\text{H}_{508}\text{I}_{16}\text{N}_{16}\text{O}_{16}\text{Si}_{29}$ (6328.7): calcd. C 39.43, H 8.03, N 3.54; found C 39.19, H 8.19, N 3.68.

Reaction of 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃)₂]₁₆ (7) with MeI: The reaction of **7** with MeI using a similar method to that described for **8** afforded the dendrimer 3G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺T)]₂₁₆ (**13**). However, the NMR analysis revealed that not all the amine groups were quaternized: roughly 29 groups were methylated, based on integration of the corresponding chemical shift of the outer $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ branch for the amine or ammonium groups.

Biocompatibility Studies

Cells: PBMC cells were derived from healthy voluntary donors, and obtained from leukophoresed blood by FicollTM gradient and elutriation centrifugation. Prior to challenge with dendrimers, PBMCs were stimulated for 48 h with phytohemagglutinin (2 $\mu\text{g/mL}$) and Interleukin 2 (IL-2, 100 IU/mL). On the day of the challenge, PBMCs were recovered and washed with Phosphate Buffered Saline (PBS), and then seeded in RPMI medium supplemented with 10% of fetal calf serum, 1% L-glutamine, antibiotics, and IL-2 (50 IU/mL), in a 5% CO₂ environment (100 000 cells per well in 96-well plates for the toxicity curve of dendrimer concentrations). The final volume in each well was 200 μL for the 96-well plates and 500 μL for the 24-well plates. For the toxicity curve of dendrimer concentrations, wells were coated with 20 μL of fibronectin/well at a concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$. The intention was not to lose cells through pipetting during the MTT assay. In the case of the 24-well plates, stimulated cells were seeded in 340 μL of complete medium.

Phase-Contrast Light Microscopy: After incubation with dendrimers, changes in morphology and characteristics of PBMCs, such as cell membrane birefringence, were observed using a phase-contrast inverted microscope (Nikon TMS, Nikon, Japan) equipped with a 100X objective (Plan 10/0,30DL/Ph1, Nikon, Japan). Live PBMCs are bright, have a defined spherical shape, and float in the culture medium. Dead cells have a darker appearance, and are mostly present in the bottom of the well. In addition, we assessed the presence or absence of cell aggregation.

MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide] Assay: This method was selected to analyze detrimental intracellular effects on mitochondria and metabolic activity. The colorimetric MTT test, based on the selective ability of viable cells to reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide to purple formazan, relies on intact metabolic activity, and is frequently used for cytotoxicity screening. After 48 h of incubation of PBMCs with different concentrations of dendrimers in a 96-well plate, culture medium containing the dendrimers was replaced with serum-free Optimum (200 μL). Sterile filtered MTT (Sigma) stock solution (20 μL) in PBS pH = 7.4 (5 mg/mL) was added to each well to achieve a final concentration of 0.5 mg MTT/mL. After 4 h, unreacted dye was removed by aspiration, and the formazan crystals were dissolved in dimethyl sulfoxide (200 μL per well) (Merck, Darmstadt, Germany). The concentration of formazan was then determined spectrophotometrically in a plate reader at a wavelength of 570 nm (test) and 690 nm (reference). The spectrophotometer was calibrated to zero absorbance using Optimum medium without cells. The relative cell viability (%) related to control wells

(cells with no dendrimer) was calculated by $[A]_{\text{test}}/[A]_{\text{control}} \times 100$. Each dendrimer concentration was tested in triplicate, according to ATCC directives.

Formation of Dendrimer/Oligonucleotide Complexes: The fluoresceinated phosphorothioate oligodeoxynucleotide (ODN) sequence was 25 bases long and corresponded to an antisense (complementary) sequence of the HIV Anti-Gag. Complex formation between dendrimer 10 or $[\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+\text{I}^-]$ and ODN was performed using an electrostatic approach. Ratios of ODN to dendrimer were based on the calculation of the electrostatic charge present on each component, for example the number of phosphate groups in the ODN versus the number of terminal ammonium groups on the dendrimer. The dendrimer or $[\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+\text{I}^-]$ was diluted in sterile distilled water at 2 mg/mL, and the ODN concentration for complexation with the carbosilane dendrimer was 0.88 μM (2.57 μg). All complexes or mixtures at different charge ratios were formed in serum-free RPMI medium (60 μL), with an incubation time of 20 min at room temp. Complex formation was assessed by evaluation of migration retardation of fluoresceinated ODN during electrophoresis on 3% agarose gel. A 100 bp DNA ladder was used as reference (Gibco BRL™).

Supporting Information (for details see the footnote on the first page of this article): Selected data as ^1H -, ^{13}C -, and ^{29}Si NMR spectra of 1, 3–6, 9–11 (Figure S1–S3 and S6–S10), 2D HMQC and HMBC spectra of 4 (Figure S4–S5), and plots of the hydrolysis processes of 10 and 12 at different concentrations (Figure S11).

Acknowledgments

We thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project BQU2001-1160), the DGI-Comunidad de Madrid (Project GR/MAT/0733/2004), the Plan Nacional de Salud (grant SAF-2004-06778, SAF-2003-09209), and the Red Temática Cooperativa de investigación en sida y genética (grant RIS G03/173 and grant RIG C03/07, respectively) of Fondos de Investigación Sanitaria (FIS) for financial support. J. F. B. is supported by a grant of Fondos de Investigación Sanitaria (BF03/00317) Madrid.

- [1] a) M. Fischer, F. Vögtle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 884–905 and references cited therein; b) K. Inoue, *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 453–571; c) J. M. Fréchet, D. A. Tomalia (Eds.), *Dendrimers and other dendritic polymers* (Wiley Series in Polymer Science), John Wiley & Sons, **2001**; d) G. R. Newkome, C. N. Moorefield, F. Vögtle (Eds.), *Dendrimers and Dendrons: Concepts, Syntheses, Applications*, Wiley-VCH, **2001**; e) G. E. Osterrom, J. N. H. Reek, P. C. J. Kamer, P. W. N. M. van Leeuwen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1828–1849; f) D. Astruc, F. Chardac, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2991–3023; g) S. M. Grayson, J. M. J. Fréchet, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3819–3867; h) S. E. Stiriba, H. Frey, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1329–1334; i) F. Aulenta, W. Hayes, S. Rannard, *Eur. Polym. J.* **2003**, *39*, 1741–1771; j) U. Boas, P. M. H. Heegaard, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43–63.
- [2] a) R. Langer, *Nature* **1998**, *392*, 5–10; b) P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7413–7417; c) G. McLachlan, B. J. Stevenson, D. J. Davidson, D. J. Porteous, *Gene Ther.* **2000**, *7*, 384–392; d) T. V. Chirila, P. E. Rakoczy, K. L. Garret, X. Lou, I. J. Constable, *Biomaterials* **2002**, *23*, 321–342.
- [3] a) J. F. G. A. Jansen, E. M. M. de Brabander-van der Berg, E. W. Meijer, *Science* **1994**, *266*, 1226–1229; b) J. F. G. A. Jansen, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4417–4418; c) C. Kojima, K. Kono, K. Maruyama, T. Takagishi, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 910–917.
- [4] a) K. Kono, M. Liu, J. M. J. Fréchet, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 1115–1121; b) M. J. Liu, K. Kono, J. M. J. Fréchet, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1999**, *17*, 3492–3503.
- [5] A. Quintana, E. Racza, L. Piehler, I. Lee, A. Myc, I. Majoros, A. K. Patri, T. Thomas, J. Mulé, J. R. Baker Jr, *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1310–1316.
- [6] a) J. Haensler, F. C. Szoka Jr, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 372–379; b) A. U. Bielinska, C. Chen, J. Johnson, J. R. Baker Jr, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 843–850; c) J. Denning, E. Duncan, *Rev. Mol. Biotech.* **2002**, *90*, 339–347; d) J. Denning, *Top. Curr. Chem.* **2003**, *228*, 227–236; e) C. L. Gebhart, A. V. Kabanov, *J. Control. Rel.* **2001**, *73*, 401–416.
- [7] C. Loup, M. A. Zanta, A. M. Caminade, J. P. Majoral, B. Meunier, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 3644–3650.
- [8] B. H. Zinselmeyer, S. P. Mackay, A. G. Schatzlein, I. F. Uchegbu, *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 960–967.
- [9] a) T. Nidome, M. Wakamatsu, A. Wada, T. Hirayama, H. Aoyagi, *J. Pept. Sci.* **2000**, 271–279; b) M. Ohsaki, T. Okuda, A. Wada, T. Hirayama, T. Nidome, H. Aoyagi, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 510–517.
- [10] N. Malik, R. Wiwattanapatapee, K. Klopsch, K. Lorenz, H. Frey, J. W. Weener, E. W. Meijer, W. Paulus, R. Duncan, *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 133–148.
- [11] S. W. Kraska, D. Seyferth, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3604–3612.
- [12] B. Luhmann, H. Lang, K. Bruning, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2001**, *168*, 481–484.
- [13] A. W. Kleij, R. van de Coevering, R. J. M. Klein Gebbink, A. M. Noordman, A. L. Spek, G. van Koten, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 181–192.
- [14] a) A. W. van der Made, P. W. N. M. van Leeuwen, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 1400–1401; b) A. W. van der Made, P. W. N. M. van Leeuwen, J. C. de Wilde, R. A. C. Brandes, *Adv. Mater.* **1993**, *5*, 466–468; c) L. L. Zhou, J. Roovers, *Macromolecules* **1993**, *26*, 963–968; d) D. Seyferth, D. Y. Son, A. L. Rheingold, R. L. Ostrander, *Organometallics* **1994**, *13*, 2682–2690; e) I. Cuadrado, C. M. Casado, B. Alonso, M. Morán, J. Losada, V. Belokly, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7613–7614.
- [15] B. D. Karstedt, U. S. Patent **1973**, 3, 775, 452.
- [16] P. D. Bailey, K. M. Morgan, *Organonitrogen Chemistry* (Oxford Chemistry Primers), **38**, 6–31, ed., Oxford University Press, **1996**.
- [17] K. Lorenz, R. Mülhaupt, H. Frey, U. Rapp, F. J. Mayer-Posner, *Macromolecules* **1995**, *28*, 6657–6661.
- [18] K. T. Welch, S. Arévalo, J. F. C. Turner, R. Gómez, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1217–1227.
- [19] a) C. Kim, I. Jung, *J. Organomet. Chem.* **1999**, *588*, 9–19; b) I. Cuadrado, M. Morán, J. Losada, C. M. Casado, C. Pascual, B. Alonso, F. Lobete in *Advances in Dendritic Macromolecules*, vol. 3 (Ed.: G. R. Newkome), Jai Press, Greenwich, **1999**, pp. 151–191; c) M. Veith, R. Elsässer, R. P. Krüger, *Organometallics* **1999**, *18*, 656–661; d) C. Kim, I. Jung, *J. Organomet. Chem.* **2000**, *599*, 208–215; e) S. Arévalo, E. de Jesús, F. J. de la Mata, J. C. Flores, R. Gómez, *Organometallics* **2001**, *20*, 2583–2592.
- [20] Selected ^1H NMR spectroscopic data in CDCl_3 for $1\text{G}[\text{Si}(\text{OMe})_2]_4$: $\delta = 3.48$ (s, 6 H, SiOMe), 1.36 (m, 2 H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0.67, 0.56 (m, 4 H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0.08 (s, 3H, OSiMe_2).
- [21] K. Rittner, A. Benavante, S. Bompard, F. Heitz, G. Divita, R. Brasseur, E. Jacobs, *Mol. Ther.* **2002**, *5*, 104–114.

Received: September 5, 2005
Published Online: February 6, 2006

Comparative Uptake of Phosphorothioate Oligonucleotides by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells from Newborns and Adults

Jesus F. Bermejo

*Laboratorio de Inmunobiología Molecular
Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid (Spain)
E-mail: jbermejo.hgugm@salud.madrid.org
Tel: (+34) 91 586 8565; Fax: (+34) 91 586 8018*

Louis Chonco

*Laboratorio de Inmunobiología Molecular
Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid (Spain)*

Rafael Samaniego

*Unidad de Microscopia Confocal
Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid (Spain)*

Geronimo Fernandez

*Laboratorio de Inmunobiología Molecular
Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid (Spain)*

Ramon Eritja

*Instituto de Biología Molecular de Barcelona
CSIC, Jordi Girona, Barcelona (Spain)*

M^a Angeles Muñoz-Fernandez.

*Laboratorio de Inmunobiología Molecular
Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid (Spain)*

Abstract

The introduction of oligodeoxynucleotides into primary cells is limited by their poor spontaneous uptake. Nevertheless, the uptake of phosphorothioate oligodeoxynucleotides (PS-ODN) by PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) from adults has been previously reported. Not only adult diseases, but also those of newborns, are tributary of treatments with ODNs. Nevertheless, we are not aware of previous reports evaluating oligodeoxynucleotides uptake by PBMCs from newborns. We compared the uptake of a fluoresceinated PS-ODN by total PBMCs, lymphocytes and monocytes from 3 healthy newborns and 3 healthy adults before and after stimulatory conditions, by fluorescence confocal microscopy and flow cytometry. The uptake ratios, uptake kinetics and PS-ODN distributions were similar in newborn and adult PBMCs. A time-dependent PS-ODN incorporation was observed, peaking at 24 hours; evidence of three different

patterns of intracellular distribution in monocytes and lymphocytes was obtained. PS-ODN uptake by monocytes was more significant than that showed by lymphocytes, and PS-ODN uptake by lymphocytes seems to be inducible by activation. The special characteristics of umbilical cord blood PBMCs such as their immunological immaturity do not preclude PS-ODN uptake. In conclusion, PBMCs from both adults and newborns would be susceptible to therapeutic approaches with PS-ODNs.

Keywords: adult; confocal; newborn; phosphorothioate, PBMCs, uptake.

Introduction

Therapies using antisense oligonucleotides have a considerable drawback. To hit intracellular RNA target sequences, oligonucleotides (PS-ODNs) have to cross cell membranes, which they do poorly because of their low lipid solubility. The “naked” PS-ODN is a large, negatively charged molecule that is repelled by the outer cell membrane (Tavitian, 2003). In general, primary cells incorporate oligonucleotides less efficiently than cell lines. The introduction of foreign DNA into primary cells such as peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) requires of electro-physical methods (Gresch et al., 2004). Nevertheless, the uptake of phosphorothioate oligonucleotides by PBMCs from adults has been previously reported. Lavigne et al. (2002) found a diffuse cytoplasmic and nuclear distribution of GEM-91 (a phosphorothioate ODN) in adult PBMCs. Hartmann et al. (1998) demonstrated in an elegant work that adult monocytes and lymphocytes differ in the degree of spontaneous oligonucleotide uptake, being this higher in monocytes (Hartmann et al., 1998; Yang et al., 2002). Yang et al., (2002) studied the effects of an antisense insulin-like growth factor-I receptor oligonucleotide transferred to human cord blood lymphocytes by a liposomal-mediated method. We are not aware of previous works evaluating spontaneous oligonucleotide uptake by PBMCs from newborn umbilical cord blood comparatively with that show by adult PBMCs. Newborn PBMCs show some differences from adult ones, such as their immaturity: most of them express CD45RA naive antigen (D'Arena et al., 1998) and show immature antigen-presenting cell interactions (Han et al., 2004); in addition, newborns PBMCs differ from adult ones in terms of recognition of some foreign molecules, such as bacterial lipopeptides (Levy et al., 2004); finally, they have a pattern of cytokine production that differs from adults (Levy et al., 2004). Various diseases that could be treated by antisense oligonucleotides could specifically affect PBMCs (such as HIV infection or lymphoproliferative disorders). These diseases affect not only adults, but also newborns and young children. On the other hand, in the two mentioned disorders, cell activation plays a pathological role. HIV replication takes place in activated CD4⁺ T cells; cancer cells are non controlled hyper-activated cells for replication. Krieg *et al* (1991) studied the uptake of oligodeoxyribonucleotides by murine lymphoid cells, and reached to the conclusion that it was inducible by mitogens (Krieg et al., 1991).

The present work studied the pattern and timing of PS-ODN uptake by PBMCs from umbilical cord blood in comparison with that showed by adult PBMCs, before and after stimulatory conditions.

Materials and Methods

Cells

PBMCs were isolated by Ficoll (CoraTM) gradient centrifugation of heparinized umbilical cord blood from 3 healthy newborns and also peripheral blood from 3 healthy adults (donor or legal tutor' permission was previously obtained). Cells were collected, washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) and cultured in RPMI 1640 culture medium (Biochrom AGTM) supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum, L-glutamine (4 mM), and gentamycin (50 µg/mL) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. A fraction of PBMCs was evaluated at this point for PS-ODN uptake. For this, 300,000 cells per well were seeded in 24-well plates at a final volume of 500 µL. Prior to challenge with PS-

ODNs, a different fraction of PBMCs was stimulated for 48 hours with phytohaemagglutinin (2 µg/mL, Abbot-Murex TM) and recombinant human Interleukin 2 (IL-2, 100 U/mL, a gift from Eurocetus TM, Madrid, Spain). The day of the challenge, stimulated PBMCs were recovered and washed with PBS. Stimulated cells were maintained in the same culture medium as above, supplemented with IL-2 (50 U/mL) (300,000 cells per well in 24-well plates). The final volume for each well was 500 µL again. Both fractions of cells (stimulated and non stimulated) were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere for 6 hours before the challenge with PS-ODN took place, in order to allow them to recover from manipulation.

Viability was determined before and after incubation with PS-ODN by trypan blue exclusion (conventional microscopy) or by propidium iodide exclusion (flow cytometric analysis). In addition, those cells with forward (FW) and side (SD) light scattering characteristics typical of apoptotic-necrotic cells were excluded from analysis in flow cytometry.

Oligonucleotide synthesis

The phosphorothioate ODN (PS-ODN) sequence was 16 bases long and corresponded to an antisense (complementary) sequence of the HIV TAR element mRNA. The sequence was fluoresceinated to develop fluorescence microscopy and flow cytometry assays: ODN (5'-fluoresceine- GCT CCC GGG CTC GAC C 3'). ODNs were prepared by using standard solid-phase 2-cyanoethyl phosphoramidites (Caruthers et al., 1987; Iyer et al., 1994; Sinha et al., 1984) in a 392 DNA synthesizer (Applied Biosystems TM). Phosphorothioate linkages were introduced by replacing the iodine solution with a solution of 3H-1,2-benzodithiol-3-one 1,1-dioxide (Iyer et al., 1994). Fluorescein was added to the 5'-end using FluorePrime fluorescein phosphoramidite (Amersham Biosciences TM). After assembly of the sequence, the ODN support was treated with 32% aqueous ammonia at 55 °C for 16 h. The ammonia solution was concentrated to dryness and the product was desalted on a NAP-10 (Sephadex G-25, Amersham Biosciences TM) column and eluted with water. The length and homogeneity of ODN was confirmed by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, by electrophoresis in HI-GEL matrix (Biotools TM, a mixture of agarose and polyacrylamide for electrophoresis of small DNAs), and reversed-phase HPLC. Purity of the full-length product was between 80-85%.

Challenge with PS-ODN

PBMCs were treated with 1 µM of fluoresceinated PS-ODN and recovered for analysis by flow cytometry or observation under confocal fluorescence microscopy at various times (1 hour, 4 hours and 24 hours). A well with non-treated PBMCs was used as control each time.

Fluorescence assays

After the end of each period of incubation of PBMCs with PS-ODN, cells were washed twice with PBS.

Fluorescence confocal microscopy

Cells for fluorescence microscopy were treated with 0.8 % Trypan Blue, TB (SigmaTM) for 5 min and then again washed twice with PBS. TB dye is excluded by viable cells but penetrates cell membranes of dying or dead cells. When TB staining is negative, membrane integrity is present. In addition, TB is an extra-cellular fluorescence quenching agent (Thiele et al., 2001). This way, extra-cellular fluorescence is not observed after TB treatment. After TB staining, cells were seeded on glass slides coated with Poly-L-Lysine, fixed with 3% paraformaldehyde, and labelled with a primary anti-CD45 purified mouse anti-human monoclonal antibody (Becton Dickinson TM). Samples were washed twice with PBS and then incubated with a secondary antibody labelled in red (Texas Red dye-conjugated AffiniPure F (ab)₂ Fragment Goat anti-Mouse IgG + IgM (H + L), Jackson ImmunoResearch TM). Cells

were washed again twice with PBS. Finally, cells were treated for nuclear staining with DAPI (VysysTM) for 10 min. and washed three times with PBS. Samples were mounted and images captured by a Leica TCS SP2 confocal microscope using different lines of excitation: 405, 488 and 594 nm. 200 hundred PBMCs were counted each time (1, 4 and 24 hs) in a middle section for intracellular presence of PS-ODN.

Flow cytometry (FC)

FC was aimed to determine the relative proportions of monocytes and lymphocytes present in each sample, and also to specifically study the uptake in both types of cells. Those cells destined to FC, were stained with an anti-CD14 antibody labelled with PC5 (Beckman-CoulterTM), washed twice with PBS and immediately disposed in acquisition tubes in Isoton medium (CoulterTM). Flow cytometric data on at least 10,000 cells per sample were acquired in a four colour Epics cytometer (Beckman-CoulterTM). In two-color flow cytometric analyses (fluoresceine-PC5), spectral overlap was corrected by compensation. Fluorescence detector settings were adjusted, so that stained cells were on scale for each parameter. Data were analyzed with Epics Elite soft-ware (Beckman-CoulterTM). In the forward/sideward scatter histogram gates were set to include the lymphocyte and monocyte populations. The monocyte gate contained 90% to 95% CD14-positive cells, the lymphocyte gate contained less than 1% CD14-positive cells. Fluorescence intensity was analysed for cells presenting higher fluorescence than background. The background was defined as the fluorescence of cells incubated with unconjugated fluorescein alone. Non-viable cells were identified by propidium iodide staining (10 mg/ml). Fluorescence histograms showing the percentage of fluoresceine positive cells were represented for each gate (lymphocytes and monocytes).

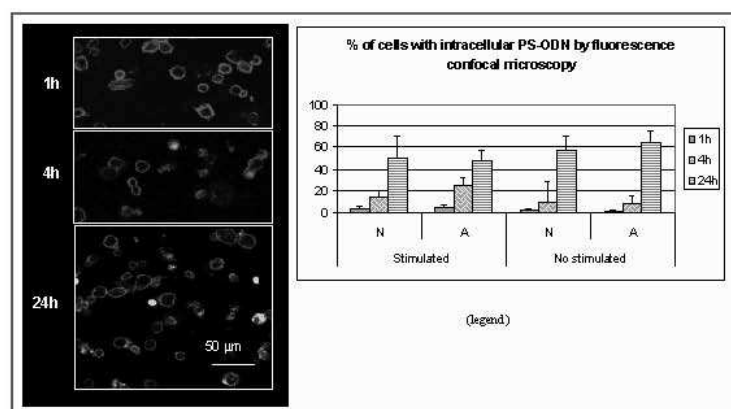
Immuno-magnetic separation

PBMCs coming from Ficoll isolation were separated in CD14 positive and CD14 negative cells by immuno-magnetic technology (MiltenyiTM) following manufacturer instructions. 95% of cells coming from the positive fraction were positive for CD14 staining by FACS, showing FW and SD typical of monocytes. Less than 2% of cells of the negative fraction were positive for CD14, showing FW and SD typical of lymphocytes. Positive fractions (monocytes) and negative fractions (lymphocytes) of each individual were incubated separately with PS-ODN for 24 hs. After that, monocytes were labeled with a primary anti-CD14 purified mouse anti-human monoclonal antibody (Becton DickinsonTM) and lymphocytes with a primary anti-CD45 purified mouse anti-human monoclonal antibody (Becton DickinsonTM). Both types of cells were additionally stained with the same secondary antibody labelled in red above mentioned and observed under the fluorescence confocal microscopy.

Results and Discussion

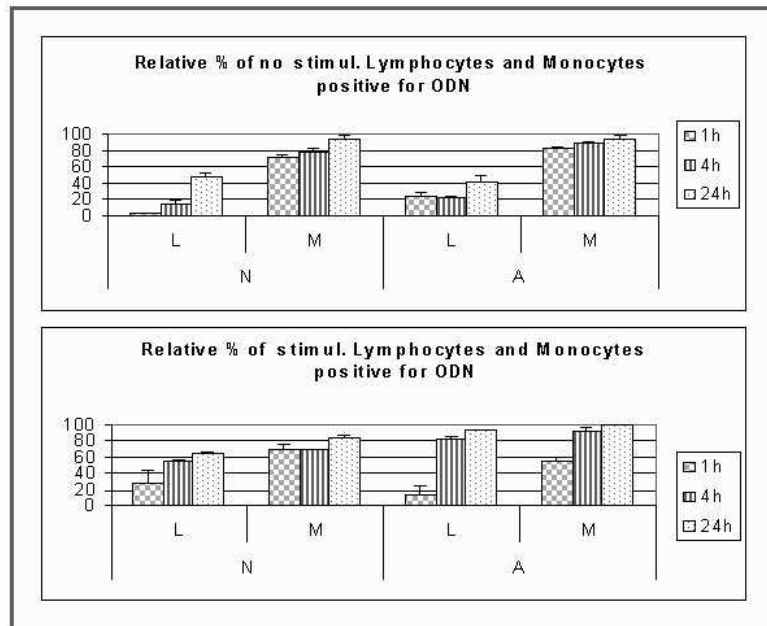
Confocal Fluorescence Microscopy of total PBMCs (Fig.1). Similar results were observed for newborn and adult PBMCs. PBMCs showed intracellular presence of PS-ODN at the fourth hour, mostly cytoplasmic. Uptake was time-dependant, peaking at 24 hs. In these preparations, both lymphocytes and monocytes were present. To study specifically the ODN incorporation in both types of cells, flow cytometry assays were developed. Patterns of ODN distribution would be studied specifically in lymphocytes and monocytes by immuno-magnetic separation, as explained later.

Fig. 1: Timing of PS-ODN uptake by stimulated / no stimulated total PBMCs from newborn and adult by fluorescence confocal microscopy. *Left (images):* example: no stimulated PBMCs from newborn. *Histogram:* percentage of PBMCs with intracellular PS-ODN. Each result is the media + SD of 3 individuals. 200 cells were counted each time for the presence/absence of PS-ODN. Dead cells were excluded by tripan blue staining.



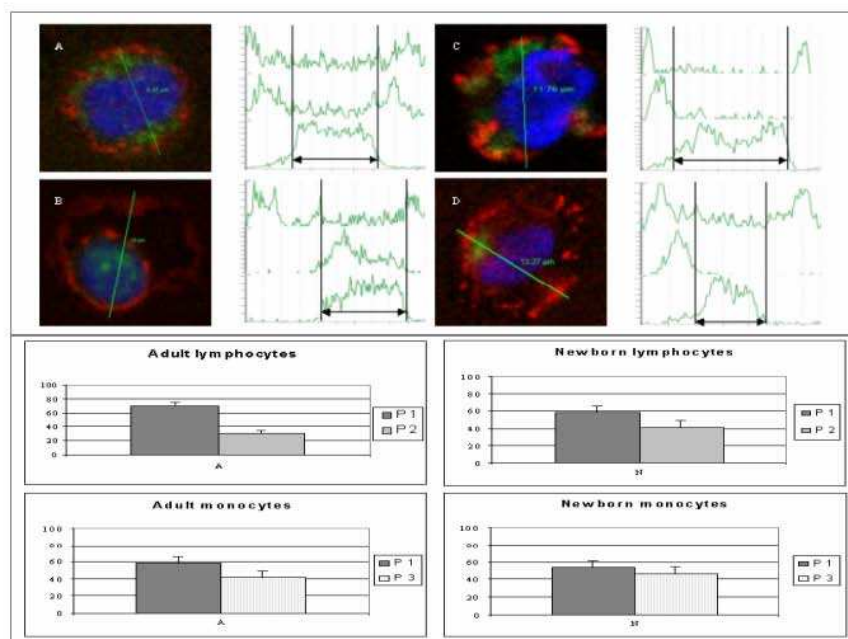
Flow cytometry of total PBMCs (Fig.2). More than 80% of cells were viable at all times in all conditions assayed; cells incubated with PS-ODN showed no significant viability reduction as compared to controls, consisting in untreated cells assayed in parallel for each time of incubation. The ratio of living lymphocytes/monocytes (L/M=results expressed as the media of 3 individuals) in no stimulated PBMCs was L/M=2 in the case of newborns and L/M= 3,3 in adults. In stimulated cells, the L/M ratio was higher in both newborns (L/M=7,3) and adults (L/M= 4,5). This increased ratio was due to the adhesion of monocytes to the bottom of the plastic culture dishes during the 48 hs of incubation with stimuli previously to be challenged with PS-ODN. Independently of the proportion of lymphocytes and monocytes of each individual, PS-ODN uptake was specifically studied for both cell populations separately: gates were drawn around living lymphocytes and living monocytes. Similar results were obtained for adults and newborns once more: a time dependant PS-ODN uptake was observed in lymphocytes and also in monocytes, peaking at 24 hours, in agreement with the results by fluorescence microscopy. The relative percentages of lymphocytes and monocytes positive for PS-ODN were evaluated. Monocytes showed an earlier uptake than lymphocytes, with more than 60% of monocytes positive for PS-ODN at 1 hour, in comparison with no more than 25% of lymphocytes positive at this time in all the assayed conditions. Interestingly, the relative percentage of monocytes positive for PS-ODN was always higher than that of lymphocytes at any time of incubation. Nevertheless, the difference was less pronounced in the case of stimulated cells, given that lymphocyte uptake showed to be induced by stimulation. This has been previously reported for murine spleen and lymph node cells (Krieg et al., 1991), but as demonstrated here, ODN uptake in human lymphocytes is also increased by activation. Fluorescence intensity of positive monocytes was higher than that of positive lymphocytes at all the assayed conditions (3,85 times as media).

Fig. 2: Specific PS-ODN uptake by lymphocytes or monocytes by FACS. Specific gates were drawn in the flow cytometry analysis for each type of cell (lymphocytes and monocytes) on the basis of the presence/absence of CD14 in membrane and their FW and SD characteristics. Relative percentages of cells positive for PS-ODN along time are represented in histograms for both gates. The analysis was performed on stimulated and no stimulated PBMCs, coming from adult and also from newborn. Each result is the media \pm SD of 3 individuals for each condition.



Confocal Fluorescence Microscopy in lymphocytes and monocytes (Fig.3). The final step was to determine the specific patterns of PS-ODN intracellular distribution in lymphocytes and monocytes after immunomagnetic magnetic separation of these cells. After 24 hours of incubation with PS-ODN, lymphocytes showed two different patterns of ODN intracellular distribution by fluorescence confocal microscopy. The predominant one was a diffuse cytoplasmic pattern (in around 60% of positive lymphocytes) (P1), but part of the lymphocytes showed nuclear presence of the ODN (around 40%) (P2). These patterns were present and similar in both adults and newborns lymphocytes. After 24 hours, 50-60% of positive monocytes showed the same diffuse cytoplasmic pattern P1 than lymphocytes, but 40-50% showed a different cytoplasmic pattern, forming aggregates of around 2 μ m length (P3). This may be related to the nature of monocytes, as part of the reticulo-endothelial system. Monocytes are cells highly specialized for endocytosis, and probably these aggregates are placed inside endosomal-lysosomal vesicles (it would be necessary to use specific labelling to confirm this). As in the case of lymphocytes, these patterns were similar in adult and newborn monocytes. To confirm the ODN emplacement in each pattern, co-localization analysis involving cell membrane (stained with anti-CD45 or anti-CD14 labelled in red), fluoresceinated PS-ODN and the nucleus (stained with DAPI) were performed at the middle section of a representative cell.

Fig. 3: Above: Patterns of PS-ODN intracellular distribution in lymphocytes and monocytes by confocal fluorescence microscopy after immuno-magnetic separation. A line was drawn along a middle section of a representative cell and fluorescence intensities along this line were represented by histograms corresponding to cell membrane marker, fluoresceinated PS-ODN and nucleus respectively (up to down for each cell image). The nucleus limits were defined between two lines in each histogram. A. Lymphocyte labelled with anti-CD45: diffuse and cytoplasmic (pattern 1). B. Lymphocyte labelled with anti-CD45: intranuclear (pattern 2). C. Monocyte labelled with anti-CD14: diffuse and cytoplasmic (pattern 1). D. Monocyte labelled with anti-CD14: cytoplasmic aggregates (pattern 3). Below: relative proportions between patterns in lymphocytes and monocytes showing intracellular PS-ODN; each result is the media \pm SD of 3 individuals; 100 hundred cells were counted each time.



Conclusions

The elevated number of experimental conditions assayed in this work (PBMCs stimulated, non stimulated, coming from adult and also from newborn, with a follow up in three steps for each case and by two different methods), allow to obtain interesting qualitative conclusions from the comparisons between all the study groups.

In general, in both activated and non activated PBMCs, from newborns and also from adults, a time-dependant uptake was observed, with the highest uptake at 24 hours of incubation with PS-ODN. The relative percentage of positive monocytes was always higher than that of positive lymphocytes at any time; lymphocytes PS-ODN uptake was induced by stimulation.

Both types of cells (monocytes and lymphocytes) were able to incorporate PS-ODN, in contradiction with the extended idea of a poor spontaneous uptake of ODNs by primary culture cells, independently of their adult or newborn origin. Differences in the pattern of ODN distribution were observed in lymphocytes as compared to monocytes; it is noteworthy that the nuclear presence of PS-ODN was only shown by lymphocytes.

Although evaluation of functional activity was not the objective of this study, HIV inhibition assays were performed with 1 μ M of non-fluoresceinated PS-ODN showing the same anti-TAR sequence above mentioned, on PBMCs coming from both adult and newborn. Multiplicity of infection (MOI) was 0,05 viral particles per cell (pNL 4.3. HIV isolate). The decrease in p24 antigen levels measured by a conventional ELISA was compared with that achieved with a PS-ODN showing the sense sequence along with that achieved with a random one (same length and aleatory sequence). Each condition was assayed by triplicate. Inhibition was similar with the three sequences (antisense, sense, random), showing a diminution of around 2/3 in the p24 levels respect the control of infected-non treated cells (data not shown). Thus, the inhibitory effects were due to non-sequence specific effects, as described previously (Lavigne et al., 2002). On the other hand, these results on inhibition do not invalidate the interesting findings obtained in regard to uptake activity.

Here it is demonstrated by first time that PBMCs coming from newborn are able to internalise PS-ODNs spontaneously in a relatively short time in complete culture medium with serum, in a similar way that adult PBMCs do. The special characteristics of umbilical cord blood lymphocytes (such as their immunological immaturity) do not preclude PS-ODN uptake. In conclusion, they could be tributary of therapeutic approaches with antisense ODNs in the same way that adult lymphocytes are.

Acknowledgments

This work was done thanks to the financial support received from "Plan Nacional de I+D" (grant: SAF 2004-6778) and also from "Red temática de investigación en SIDA y genética" (grant: RIS 603/173, grant RIG C03/07). Jesus F. Bermejo is supported by a grant coming from the "Fondo de Investigaciones Sanitarias", Madrid. The Leica TCS SP2 confocal microscope was acquired with the grants donated by the "Fondo de Investigaciones Sanitarias" to the "Fundación para la Investigación del Hospital Gregorio Marañón", Madrid.

References

- [1] Caruthers, MH et al. 1987. Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method. *Methods Enzymol.* 154, 287-313.
- [2] D'Arena, G et al. 1998. Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features. *Haematologica.* 83, 197-203.
- [3] Gresch, O et al. 2004. New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods.* 33, 151-163.
- [4] Han, P., McDonald, T., Hodge, G., 2004. Potential immaturity of the T-cell and antigen-presenting cell interaction in cord blood with particular emphasis on the CD40-CD40 ligand costimulatory pathway. *Immunology.* 113, 26-34.
- [5] Hartmann, G et al 1998. Spontaneous and cationic lipid-mediated uptake of antisense oligonucleotides in human monocytes and lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 285, 920-928.
- [6] Iyer, R.P et al. 1994. Synthesis, hydrolytic behavior, and anti-HIV activity of selected acyloxyalkyl esters of trisodium phosphonoformate (foscamet sodium). *J Pharm Sci.* 83, 1269-1273.
- [7] Krieg, A.M. et al. 1991. Uptake of oligodeoxyribonucleotides by lymphoid cells is heterogeneous and inducible. *Antisense Res Dev.* 1, 161-171.
- [8] Lavigne, C et al. 2002. Is antisense an appropriate nomenclature or design for oligodeoxynucleotides aimed at the inhibition of HIV-1 replication? *AAPS PharmSci.* 4, E9.
- [9] Levy, O et al. 2004. Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. *J Immunol.* 173, 4627-4634.
- [10] Sinha, N.D et al. 1984. Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of beta-cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucleic Acids Res.* 12, 4539-4557.
- [11] Tavitian, B., 2003. In vivo imaging with oligonucleotides for diagnosis and drug development. *Gut.* 52 Suppl 4, iv40-47.
- [12] Thiele, L et al. 2001. Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages? *J Control Release.* 76, 59-71.
- [13] Yang, Y, Niu, J, Guo, L. 2002. The effects of antisense insulin-like growth factor-I receptor oligonucleotide on human cord blood lymphocytes. *J Mol Endocrinol.* 28, 207-212.

Water-Soluble Carbosilane Dendrimers: Synthesis Biocompatibility and Complexation with Oligonucleotides; Evaluation for Medical Applications

Jesús F. Bermejo,^[a, e] Paula Ortega,^[b, e] Louis Chonco,^[a] Ramon Eritja,^[c] Rafael Samaniego,^[d] Matthias Müllner,^[a] Ernesto de Jesús,^[b] F. Javier de la Mata,^{*,[b]} Juan Carlos Flores,^[b] Rafael Gomez,^{*,[b]} and Angeles Muñoz-Fernandez^{*,[a]}

Abstract: Novel amine- or ammonium-terminated carbosilane dendrimers of type $nG-[Si\{OCH_2(C_6H_5)-3,5-(OCH_2-CH_2NMe_2)_2\}]_n$, $nG-[Si\{O(CH_2)_2N(Me)-(CH_2)_2NMe_2\}]_n$ and $nG-[Si\{(CH_2)_3-NH_2\}]_n$ or $nG-[Si\{OCH_2(C_6H_5)-3,5-(OCH_2CH_2NMe_3^+I^-)\}]_n$, $nG-[Si\{O-(CH_2)_2N(Me)(CH_2)_2NMe_3^+I^-\}]_n$ and $nG-[Si\{(CH_2)_3NH_3^+Cl^-\}]_n$ have been synthesized and characterized up to the third generation by two strategies: 1) alcoholysis of Si–Cl bonds with amino alcohols and subsequent quaternization with MeI, and 2) hydrosilylation of allylamine with Si–H bonds of the dendritic systems and subsequent

quaternization with HCl. Quaternized carbosilane dendrimers are soluble in water, although degradation is apparent due to hydrolysis of Si–O bonds. However, dendrimers containing Si–C bonds are water-stable. The biocompatibility of the second-generation dendrimers in primary cell cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and erythrocytes have been analyzed, and they show good toxicity

profiles over extended periods. In addition, we describe a study on the interactions between the different carbosilane dendrimers and DNA oligodeoxynucleotides (ODNs) and plasmids along with a comparative analysis of their toxicity. They can form complexes with DNA ODNs and plasmids at biocompatible doses via electrostatic interaction. Also a preliminary transfection assay has been accomplished. These results demonstrate that the new ammonium-terminated carbosilane dendrimers are good base molecules to be considered for biomedical applications.

Keywords: carbosilanes • dendrimers • DNA • drug delivery • oligonucleotides

Introduction

There is currently significant interest in dendrimers as a result of their potential applications, including light harvesting and energy transfer, nanoscale catalysis, chemical sensors, unimolecular micelles, enzyme mimics, encapsulation of guest molecules, molecular recognition, diagnostic agents, and gene and drug delivery.^[1] In particular, the structural precision of dendrimers has motivated numerous studies aimed at biomedical applications. One of the most active research areas in dendrimer-based therapeutics is DNA transfection. This application is currently based on viral vectors as the most efficient gene-transfer agents. However, the use of viral vectors suffers from adverse effects, such as immune reaction against the viral vector or lymphoproliferative syndromes associated with oncogene dysregulation.^[2] To overcome these drawbacks, nonviral vehicles such as cationic liposomes, polymers, and dendrimers have been developed. Once in contact with negatively charged DNA oligodeoxynucleotides (ODNs) or plasmids, cationic systems form electrostatic complexes with the nucleic acids, known as lipo-

[a] Dr. J. F. Bermejo, L. Chonco, M. Müllner, Dr. A. Muñoz-Fernandez
Laboratorio de Inmunobiología Molecular
Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid (Spain)
Fax: (+34)91-586-8018
E-mail: mmunoz.hugm@salud.madrid.org

[b] P. Ortega, Dr. E. de Jesús, Dr. F. J. de la Mata, Dr. J. C. Flores,
Dr. R. Gomez
Departamento de Química Inorgánica
Universidad de Alcalá, Campus Universitario
28871 Alcalá de Henares (Spain)
Fax: (+34)91-885-4683
E-mail: javier.delamata@uah.es
rafael.gomez@uah.es

[c] Dr. R. Eritja
Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC
Jordi Girona, Barcelona (Spain)

[d] Dr. R. Samaniego
Unidad de Microscopía Confocal
Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid (Spain)

[e] Dr. J. F. Bermejo, P. Ortega
Paula Ortega and Jesús F. Bermejo contributed equally to the development of this work.

Supporting Information for this article is available on the WWW under <http://www.chemurj.org/> or from the author.

plexes, polyplexes or dendriplexes. The use of liposomes for transfection purposes was first described in 1987.^[3] Cationic lipids prepared for this purpose are commercially available (e.g., Cytofectin and Lipofectin). However, they have side-effects such as inflammatory lung reactions,^[4] and transfection may fail in the presence of serum. The main drawback of the use of conventional degradable polymers as delivery agents, beside their polydispersity, is their thermodynamic instability, which results in a short in vivo lifetime of the active species.^[5]

Dendrimers represent an alternative approach for the transfection of nucleic acids in a wide range of cells. The major advantage of dendrimers over other nonviral vehicles is their uniform structure and the versatility with which their skeletons and surfaces can be modified, which allows precise characterization of the nucleic acid/vector complex and a more accurate and systematic analysis of the transfection process. The first study on using dendritic macromolecules for transfection, reported in 1993, used polyamidoamine (PAMAM) dendrimers,^[6] and since then extensive studies have been performed.^[7] Good results are typically achieved with sixth- or seventh-generation dendrimers. However, the transfection efficiency can be increased two- to threefold when PAMAM is activated by heat treatment (e.g., Superfect (SF)).^[8]

Another class of potential transfecting agents are phosphorus-containing dendrimers,^[9] which can be synthesized up to the twelfth generation. The dendritic surface has been grafted with protonated or methylated terminal tertiary amines and examined as transfecting agent for the luciferase gene in 3T3 cells. The efficiency increased as a function of the dendrimer generation, although a constant value was reached between generations three and five. Furthermore, these dendrimers exhibit improved transfection efficiency when serum is present.

Other kinds of dendritic macromolecules, such as polypropylenimine (PPI),^[10] and polylysine^[11] dendrimers, have also been studied as potential DNA or ODN carriers. For instance, low-generation PPI dendrimers have also shown gene-transfection ability in vitro with low cytotoxicity, although at higher generations increased toxicity prohibits their use.

To our knowledge, no studies concerning the use of water-soluble carbosilane-based dendrimers as potential carriers for DNA or ODNs or for other biomedical applications have been published, although an in vitro biocompatibility study on poly(ethylene oxide)-grafted carbosilane dendrimers has recently been reported.^[12] Only three synthetic studies of polycationic silane dendrimers have been reported previously,^[13–15] and only one of them has medical implications.^[15]

We recently developed a synthetic strategy for the preparation of new peripheral amine- and ammonium-terminated carbosilane dendrimers of type $nG-[Si(OCH_2CH_2NMe_2)]_x$ and $nG-[Si(OCH_2CH_2NMe_3^+I^-)]_x$, and a preliminary evaluation of their toxicity and complexation with ODNs was carried out, mainly on second-generation dendrimers 2G-

$[Si(OCH_2CH_2NMe_3^+I^-)]_8$ (**1**) and 2G- $[Si(OCH_2CH_2NMe_3^+I^-)]_8$ (**2**).^[16] Here we describe the synthesis of new water-soluble carbosilane dendrimers up to the third generation and analyze their biocompatibility in primary cell cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and erythrocytes. These data allow a comparative analysis of the toxicity of the different carbosilane macromolecules. In addition, we describe a study on complex formation between these dendrimers and ODNs. These studies provide essential insights into the potential of these carbosilane dendrimers as drug delivery systems, and in particular for their use in delivery of DNA (ODNs, plasmids).

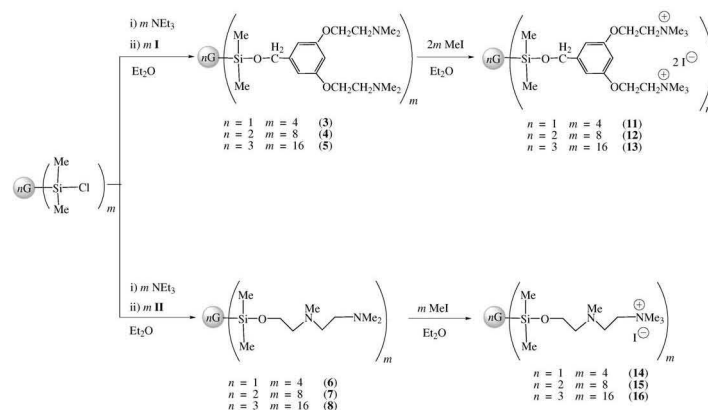
Results and Discussion

We previously prepared a family of new peripheral amine- and ammonium-terminated carbosilane dendrimers by alcoholysis of the well-known chlorosilane-terminated dendrimers^[17] $nG-(SiCl)_x$, with *N,N*-dimethylethanolamine and subsequent quaternization with MeI to afford dendrimers of type $nG-[Si(OCH_2CH_2NMe_2)]_x$ and $nG-[Si(OCH_2CH_2NMe_3^+I^-)]_x$, respectively.^[16] However, all these systems are sensitive to hydrolysis by slow cleavage of the Si–O bonds. To study such behavior and to get better insight into the potential biomedical applications of the carbosilane systems, new families of dendrimers were prepared.

Amine-terminated carbosilane dendrimers: We studied the synthesis of new dendrimers with amino groups at their periphery. For this purpose two general strategies were developed: 1) an extension of the alcoholysis of dendritic Si–Cl bonds by using modified terminal amine fragments, and 2) hydrosilylation of allyl amines with dendritic Si–H bonds.

Dendrimers formed by alcoholysis of dendritic Si–Cl bonds: Chlorosilane-terminated dendrimers of type $nG-(SiCl)_x$ ($n = 1, 2$ and 3 ; $x = 4, 8$ and 16) were synthesized as reported previously^[17] and formed the starting materials for the preparation of new dendrimers by alcoholysis. Two different amino alcohols were used: 3,5-($NMe_2CH_2CH_2O$)₂C₆H₃CH₂OH (**I**) and $Me_2NCH_2CH_2N(Me)CH_2CH_2OH$ (**II**). The latter was obtained from commercial sources, and its selection was motivated by presence of a second amino group that, if it is not quaternized, may trap endosomal protons and reducing nucleases. The former was elected to restrict the hydrolysis process and was synthesized previously (see Experimental Section).

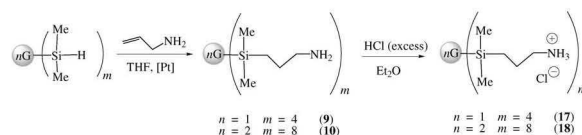
Chlorosilane-terminated dendrimers were treated with stoichiometric amounts of amino alcohol **I** or **II** in diethyl ether in the presence of an excess of NEt_3 to afford the corresponding amine-terminated dendrimers $nG-[Si(OCH_2(C_6H_3)-3,5-(OCH_2CH_2NMe_2)_2)]_x$ ($n = 1, x = 4$ (**3**); $n = 2, x = 8$ (**4**); $n = 3, x = 16$ (**5**)) and $nG-[Si(OCH_2)_2N(Me)-(CH_2)_2NMe_2]]_x$ ($n = 1, x = 4$ (**6**); $n = 2, x = 8$ (**7**); $n = 3, x = 16$ (**8**)) in high yields as colorless or yellow oils (Scheme 1). All



Scheme 1.

these dendrimers are soluble in all common organic solvents but insoluble in water.

Dendrimers formed by hydrosilylation with dendritic Si-H bonds: SiH-terminated carbosilane dendrimers of type $nG-(SiH)_x$ ($n=1$ and 2 ; $x=4$ and 8) were synthesized as reported previously^[17(a,e)] and used in the hydrosilylation of allylamine. The reactions were performed in ampoules with J Young valves using THF as solvent and the Speier catalyst^[18] and heating the mixture at 120°C for 4 h to afford the corresponding dendrimers $nG-[Si(CH_2)_3NH_2]_x$ ($n=1$, $x=4$ (**9**); $n=2$, $x=8$ (**10**)) in high yields as colorless oils (see Scheme 2). ^1H NMR spectroscopy was used to follow the



Scheme 2.

progress of the reactions by monitoring the loss of the Si-H resonance. The processes occurred exclusively by β -addition to give the $-SiCH_2CH_2CH_2NH_2$ group, and neither α -addition products nor N -silylated byproducts were detected in the ^1H NMR spectra of the crude products. All of these dendrimers are soluble in all common organic solvents but insoluble in water.

The NMR spectroscopic, MALDI-TOF MS and analytical data for compounds **3–10** are consistent with their proposed structures (Schemes 1 and 2).

Ammonium-terminated carbosilane dendrimers: The ammonium-terminated dendrimers were prepared by adding MeI to parent dendrimers **3–8** in diethyl ether (see Scheme 1). Dendrimers **3–5** reacted with an excess of MeI to cleanly afford the corresponding quaternized derivatives $nG-[Si\{OCH_2(C_6H_5)-3,5-(OCH_2CH_2NMe_3^+I^-)_2\}]_x$ ($n=1$, $x=4$ (**11**); $n=2$, $x=8$ (**12**); $n=3$, $x=16$ (**13**)) as white solids. In the conversion of amine-terminated dendrimer **5** to **13**, some dimethylamino groups remained unquaternized. The ^1H NMR spectrum revealed that roughly 85% of the amino groups were quaternized, even if we used a large excess of MeI and prolonged reaction times. The stoichiometric reaction of dendrimers **6–8** containing 4, 8 and 16 terminal $[O-(CH_2)_2N(Me)(CH_2)_2NMe_2]$ units, respectively, with same number of equivalents of MeI gave the corresponding outermost quaternized terminal amine compounds $nG-[Si\{O-(CH_2)_2N(Me)(CH_2)_2NMe_3^+I^-\}]_x$ ($n=1$, $x=4$ (**14**); $n=2$, $x=8$ (**15**); $n=3$, $x=16$ (**16**)), albeit with small amounts of doubly methylated branches (less than 1–3% depending on the generation). Hence, minor chemical competition between the two types of amino groups per peripheral unit was observed, although the selectivity increased with increasing generation or peripheral hindrance of the dendrimers.

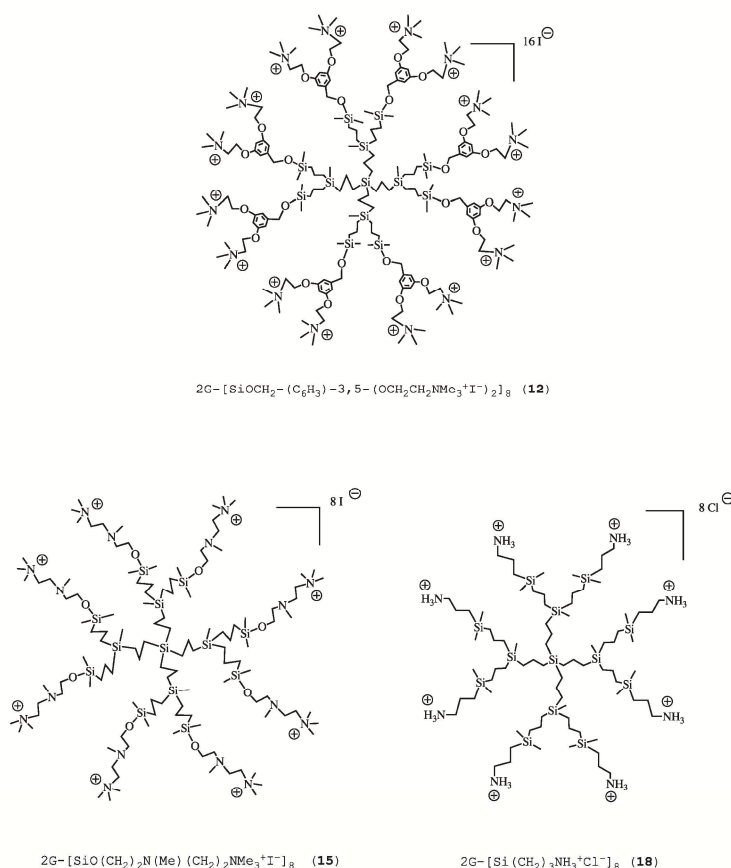
Dendrimers **9** and **10** were quaternized by adding stoichiometric amounts or an excess of HCl to produce $nG-[Si(CH_2)_3NH_3^+Cl^-]_x$ ($n=1$, $x=4$ (**17**); $n=2$, $x=8$ (**18**)) as white solids (see Scheme 2).

All compounds **11–18** are water-soluble, although solubility decreases with increasing generation. However, the den-

drimers with Si–O bonds decomposed slowly by hydrolysis of these bonds. This behavior was observed in dendrimers **1** and **2** with $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3$ terminal units.^[6] However, the hydrolysis rates of dendrimers **11–13** containing quaternized groups derived from amino alcohol **1** are considerably attenuated with respect to dendrimers with fragment **II** as peripheral groups, which are similar to those in **1** and **2**. In contrast, dendrimers **17** and **18** based on Si–C bonds are completely stable towards hydrolysis.

The NMR spectroscopic and analytical data of **11–18** are consistent with their proposed structures (Schemes 1–3). The ^1H NMR spectra were recorded in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ at room

temperature for dendrimers **11–16**, and in D_2O for dendrimers **17** and **18**. In these solvents the line widths of these spectra tended to be broader than those of derivatives soluble in common organic solvents. The ^1H and ^{13}C NMR spectra of the quaternized dendrimers exhibit identical resonance patterns to those observed in their neutral counterparts **3–10** for the carbosilane framework, although broader signals are seen with increasing generation (see Experimental Section and Supporting Information). In general for the ^1H NMR spectra, the quaternization of the amine groups results in deshielding of about $\Delta\delta=1$ ppm for the geminal methylene and methyl groups directly bound to the charged



Scheme 3. Molecular representations of ammonium-terminated carbosilane dendrimers **12**, **15**, and **18**.

nitrogen atoms, whereas small downfield shifts of around $\Delta\delta = 0.3\text{--}0.4$ ppm are found for the vicinal methylene groups. Beyond these positions, no displacement is observed for the chemical shift due to the positive charge on the nitrogen atoms. However, this effect is more evident in the compounds quaternized by MeI than those prepared with HCl. Analogous behavior is observed for the carbon atoms in the ^{13}C NMR spectra. Dendrimers **14–16** with outermost quaternized amines exhibit different ^1H and ^{13}C NMR patterns for singly and doubly methylated branches that facilitate their discrimination (see Experimental Section and Supporting Information). In any case, signals attributed to the monomethylated forms of the innermost quaternized amine were observed, even when a deficit of reagent was added. This strongly suggests that the quaternization process starts at the outermost amine and subsequently proceeds to the innermost when a slight excess of MeI is added. Attempts to carry out MALDI-TOF MS of these dendrimers failed probably due, *inter alia*, to solubility problems.

Toxicity evaluation of dendrimers: Quaternized second-generation carbosilane dendrimers **12**, **15**, and **18** were tested on a primary cell culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors as an initial screening for biocompatibility, and the values compared with preliminary data shown by dendrimers **1** and **2**.^[16] First-generation dendrimer **14** was too water sensitive for toxicity evaluation, while third-generation dendrimers were not tested due to solubility problems.

Toxicity was evaluated by challenging PBMCs with increasing concentrations of the free quaternized carbosilane dendrimers, in order to obtain a range of biocompatibility. Toxicity was initially evaluated by 1) visual examination under a phase-contrast light microscope and 2) MTT toxicity assay.

According to microscopy studies (see Supporting Information), the carbosilane dendrimers best tolerated by PBMCs were **12** and **15**, whereas the dendrimer **18** showed the highest toxicity and dendrimers **1** and **2** had intermediate toxicity profiles. Superfect (SF) and a 4G-PAMAM showed higher toxicity than all second-generation carbosilane dendrimers. However, this is not surprising because of it is known that dendrimer toxicity increases with increasing generation.^[14,19]

In the MTT assay, cells treated with **12** and **15** showed higher mitochondrial activity (MA) (Figure 1A). Dendrimer **18** was more toxic at $1\text{ }\mu\text{M}$, but the toxicities of **1** and **2** strongly increase from $5\text{ }\mu\text{M}$ and beyond. However, taking into account the data from visual observation along with the MTT values as a whole, it is deduced that whilst **1** and **2** induced diminution of birefringence or formation of cell aggregates, **12** and **15** did not and are thus the most biocompatible systems for PBMCs. In addition, and in view of the results of this initial screening, one can conclude that the upper limit of the carbosilane dendrimer concentration to be further considered for biological assays should be between 1 and $5\text{ }\mu\text{M}$.

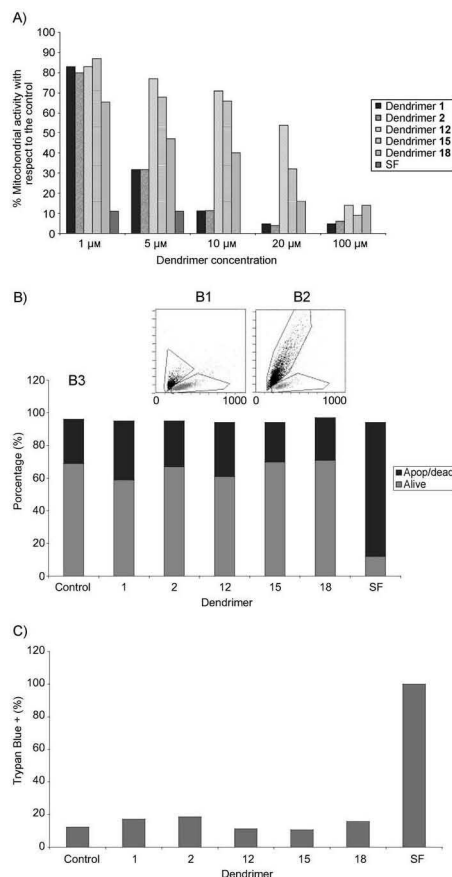


Figure 1. A) Quantification of mitochondrial activity (MA) of PBMCs by MTT test after 48 h of incubation with different dendrimer concentrations. MA is expressed as percentage with respect to the MA of the control (untreated cells). B) Flow cytometry of PBMCs after 72 h of incubation with dendrimers: B1) representation of cells treated with dendrimer **15**; B2) representation of cells treated with SF dendrimer; B3) evaluation of the percentage of cells with FW and SD corresponding to live cells against the percentage of cells corresponding to dead/apoptotic cells. Black areas denote dead cells, and grey areas live cells. C) Percentage of cells positive for Trypan Blue after 72 h of incubation with dendrimers. All experiments were assayed three times.

Because of the apparent discrepancy between MTT assays and the microscopic observations, which were also found for other polycationic dendrimers, such as those based on the phosphoramidothioate backbone,^[20] toxicity of the carbosi-

lane dendrimers was studied by additional methods: flow cytometry, Trypan Blue (TB) uptake, DAPI staining and in vivo microscopy. In these studies, the incubation time was increased to 72 h, and the doses assayed for carboxilane dendrimers were in the range of 2–4 μM , while less than 1 μM was used for the reference SF PAMAM dendrimer.

Flow cytometry (FC): PBMCs treated with carboxilane dendrimers at these doses did not show significant changes in their forward (FW) and side (SD) light-scattering characteristics after 72 h of incubation. Moreover, the percentage of unviable cells was similar in all cases assayed to that of untreated cells (around 20%, see Figure 1B). On the other hand, PBMCs treated with SF dramatically increased their mortality.

Trypan Blue (TB) uptake: TB is excluded by viable cells but can penetrate cell membranes of dying or dead cells. When TB staining is negative, membrane integrity is present. The percentage of cells positive for TB staining for the wells treated with dendrimers **1**, **2**, **12**, **15**, and **18** was similar to that found in untreated cells (Figure 1C). However, cells treated with SF displayed significant mortality compared with control cells.

DAPI staining: An additional test of cell viability was provided by the staining of cell nuclei with the vital dye DAPI. Cell nuclei undergoing apoptosis or necrosis show reduced nuclear size, chromatin condensation and nuclear fragmentation, processes that can be easily detected by DAPI staining. Cells treated with all carboxilane dendrimers had similar appearances to untreated cells, showing rounded nuclei with homogeneously distributed chromatin. In contrast, cells treated with SF decreased dramatically in number. Furthermore, the cell pellet obtained for DAPI staining after centrifugation of PBMCs treated with SF was notably small. This reduction in cell number was confirmed by microscopy (see Supporting Information).

Time-lapse video microscopy: We monitored cell behavior by time-lapse and in vivo microscopy for cells treated with carboxilane dendrimers. In all cases, cells showed similar patterns of movement and migration to untreated control cells (for an example, see Supporting Information).

Therefore, from these four additional methods, all carboxilane dendrimers **1**, **2**, **12**, **15**, and **18** assayed under these conditions showed good biocompatibility on PBMC cells.

Toxicity was also evaluated on erythrocytes challenged with increased dendrimer concentrations by means of induction of hemagglutination along with hemoglobin release from the red blood cells. Dendrimers **1**, **2**, **12**, and **15** were used for this assay, and dendrimer **18** was not included because it was shown to be the most toxic for lymphocytes in some of the methods and concentrations employed before. A fourth-generation PAMAM dendrimer was also used for comparison. From visual examination, dendrimer **15** showed the lowest agglutination, while for dendrimer **12** morpholog-

ic changes were observed even at 1 μM concentration. Analogous results were detected for 4G PAMAM dendrimer (see Supporting Information).

The interaction of cationic dendrimers with negatively charged membranes was also studied by hemolysis experiments. The release of hemoglobin was used to quantify the membrane-damaging properties of the dendritic macromolecules. Lysis of red blood cells precludes direct intravenous delivery of the desired agents and often enhances their toxicity when administered by other routes. Hemolysis was recorded spectrophotometrically at 1 h and considered 100% in the positive control (cells treated with Triton X-100) and 7% in the negative control of untreated cells. The absorbances of the different wells were expressed as percentages with respect to the absorbance of the positive control well, and from this percentage, the 7% corresponding to the negative control was subtracted. A value of 10% was considered as the cut-off for toxicity.^[13a] Carboxilane dendrimers **12** and **15** induced less hemoglobin release in the 1–5 μM concentration range, although at 5 μM , these two dendrimers slightly exceed 10% (see Figure 2). In spite of this good result, com-

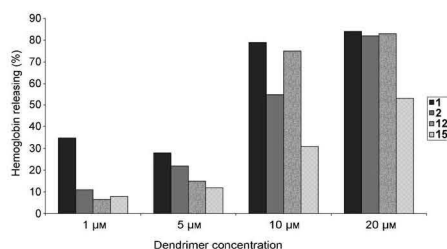


Figure 2. Hemolysis test: hemoglobin release after 1 h with different dendrimer concentrations. The experiment was assayed three times.

pound **12** induced hemagglutination, while **15** did not at this concentration (see Supporting Information). It can be said that polycation/DNA complexes are usually less cytotoxic than uncomplexed polycations.^[21] Thus, the experimental conditions chosen here reflect the worst-case scenario for cytotoxicity. In conclusion, taking into account both hemagglutination and hemoglobin release from erythrocytes, as well as toxicity in lymphocytes, dendrimer **15** is the least harmful for both types of cell at higher concentrations and thus a good candidate as delivery agent.

Antigenicity: lymphoproliferative assay: When a new macromolecule is under consideration for a potential biological application, it is important that it does not constitute an unspecific antigenic stimulus (unless desired for development of immunogens). Again we challenged PBMCs with different concentrations of carboxilane dendrimers **1**, **2**, **12**, and **15** looking for induction/noninduction of proliferation, compared with that achieved with an unspecific mitogenic stim-

uli such as phytohemagglutinin (PHA). From the data shown in Figure 3, none of the carbosilane dendrimers constituted an antigenic stimulus for PBMCs at the tested concentrations (2 and 5 μM).

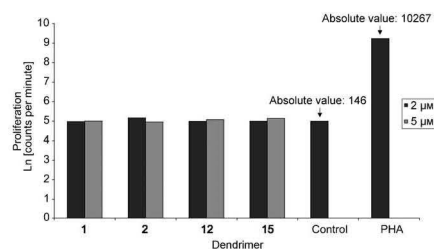


Figure 3. Lymphoproliferative assay: antigenicity of the carbosilane dendrimers in the proliferation of PBMCs exposed to two different concentrations of each dendrimer and compared with that achieved with phytohemagglutinin (PHA). Data expressed as the Napierian logarithm of the number of counts per minute. The experiment was assayed three times.

Dendriplex formation: Having evaluated the biocompatibility range for the new water-soluble ammonium carbosilane dendrimers, we studied their capacities for complexation with oligodeoxynucleotides (ODN) to give so-called dendriplexes. Quaternized second-generation dendrimers **12**, **15**, and **18** as well as elsewhere-prepared **1** and **2**,^[16] were used for potential dendriplex formation. Dendriplex formation was studied by electrophoresis in agarose gels with fluoresceinated phosphorothioate ODNs. Mixtures were prepared with an excess of positive charge to provide a sufficient number of charges to interact with the ODN. Preliminary results^[16] for dendrimer **1** at different electrostatic charge ratios (+)/(−) showed retardation of ODN migration in all cases, that is, the ODN is associated with the dendrimer, even at 2:1 charge ratio, for which the dendrimer concentration is in the aforementioned range of biocompatibility.^[16] Consequently, the carbosilane dendrimers of this work were complexed with ODN at an electrostatic charge ratio (+)/(−) of 2/1. Figure 4 shows agarose gel electrophoresis of the mixtures of dendrimers **12**, **15**, or **18** and ODN in comparison with those formed with **1** and **2**. In the gel presented in Figure 4A1, the dendrimers were diluted in water and immediately mixed with ODN and run in an agarose gel. In all cases the different carbosilane dendrimers retained the ODN during its migration, and this demonstrates successful complex formation. With regard to the hydrolysis problems presented by the Si–O-containing carbosilane dendrimers, we recently demonstrated that the terminal units released after hydrolytic scission were not able to retard ODN migration, and that the whole functionalized dendrimer was necessary to form complexes with DNA.^[16] An analogous result was recently obtained in binding experiments on DNA with

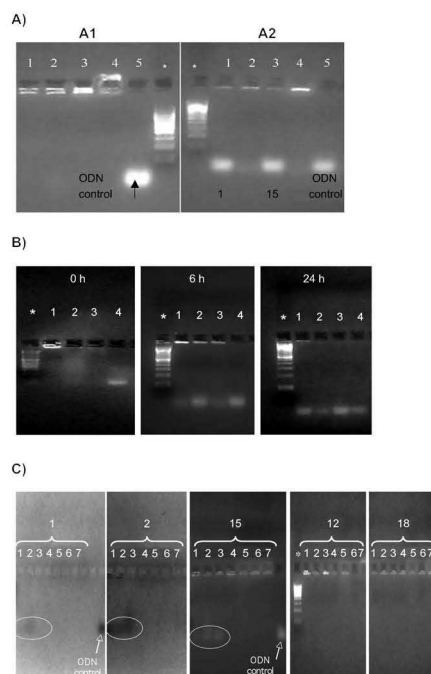


Figure 4. A) Electrophoresis of carbosilane dendrimer/ODN dendriplexes with (+)/(−)=2/1 on 3% agarose gel: 1) **1**/ODN; 2) **18**/ODN; 3) **15**/ODN; 4) **12**/ODN; 5) ODN only. A1) Dendrimers dissolved in water and immediately mixed with ODN; A2) dendrimers dissolved in water for 24 h and then mixed with ODN prior to electrophoresis. Asterisk denotes 100 bp DNA ladder as reference. B) Electrophoresis of carbosilane dendrimer/ODN dendriplexes with (+)/(−)=2/1, on 3% agarose gel at pH 7.4 at different incubation times: 1) **1**/ODN; 2) **2**/ODN; 3) **15**/ODN; 4) ODN only. Asterisk denotes 100 bp DNA ladder as reference. C) Electrophoresis of carbosilane dendrimer/ODN dendriplexes with (+)/(−)=2/1 on 3% agarose gel at different pHs: 1) pH 2.8; 2) pH 3.7; 3) pH 4.7; 4) pH 5.7; 5) pH 6.4; 6) pH 7.4; 7) pH 8.0. Asterisk denotes 100 bp DNA ladder as reference. The experiments were assayed three times.

spermine and low-molecular weight dendrons based on Newkome-type branching.^[22] This finding confirms that the hydrolysis processes suffered by the carbosilane dendrimers are slow under highly dilute conditions. It is noteworthy that our results show that second-generation carbosilane dendrimers are capable of complexing ODNs to give [ODN/dendrimer] through electrostatic interactions, whereas higher generations of other dendrimer topologies have been used in the literature.^[7,20,21] For the gel visualized in Figure 4A2, the dendrimers were dissolved in water for 24 h and then mixed with ODN before electrophoresis. After this time, dendrimers **1** and **15** were not able to retain the ODN

during its migration, that is, the time dissolved in water affects the ability of the dendrimer to form complexes with the ODN. On the other hand, **12** and **18** were not affected to the same degree and preserved the capacity to retain the majority of the ODN during its migration. Thus, under these conditions dendrimers containing Si–O bonds lost their ability to bind ODNs after 24 h in water in dilute concentrations, except for dendrimer **12**. Likewise, dendrimer **18** is also water-stable because of the presence of robust Si–C bonds.

For water-sensitive dendrimers **1**, **2**, and **15**, a second type of electrophoretic migration assay was developed consisting of running dendriplexes in a gel after 0, 6, and 24 h of incubation in an atmosphere of 5% of CO₂ at 37°C. As can be seen from Figure 4B, the three dendrimers released the ODNs progressively. It is possible to conclude that **1**, **2**, and **15** have the ability to release the ODN in a time-dependant way when they are dissolved in water. This feature suggests potential use in controlled release of ODNs and perhaps of other polyanionic drugs. The controlled release of active substances based on the chemical stability of the linker towards hydrolysis has been described, for example, in the case of phosphorus dendrimers on the basis of slow degradation of imine bonds.^[23]

Dendriplex stability was also tested at different pH values. Blood physiological pH is 7.4, but anatomical or cellular locations with more acidic (stomach, endosome/lysosome) or basic (duodeni) pH exist. Dendriplexes were formed as usual and exposed to different solutions from acid to basic pH (2.8, 3.7, 4.7, 5.7, 6.4, 7.4 and 8.0) prior electrophoresis (see Figure 4C). Dendriplexes formed between **12** or **18** and ODN were stable at all tested pH values, whereas dendriplexes formed between **15** and ODN released the ODN at acid pH (<5.7). For dendrimers **1** and **2** the results were similar: dendriplexes **1**/ODN dissociated at pH <4.7, and dendriplexes **2**/ODN at pH <5.7. All dendriplexes were stable at basic pH (up to pH 8.0). Thus, in an acidic environment dendriplexes **1**/ODN, **2**/ODN and **15**/ODN would release the ODN, whereas under basic conditions they would remain stable. This opens new perspectives for applications that need pH-controlled ODN release.

Toxicity profiles of dendriplexes formed by carbosilane dendrimers **1**, **2**, **12**, **15**, and **18** were studied by some of the methods used for dendrimers alone: flow cytometry and Trypan Blue (TB) uptake (see Supporting Information). The data showed very similar values to those obtained for dendrimers without complexation to ODN, as has been reported elsewhere.^[19]

In addition, the ammonium-terminated second-generation carbosilane dendrimers were able to complex with plasmids. As a demonstrative example, dendrimer **1** formed dendriplexes with the NfκB plasmid (which codifies Nf-κappaB protein involved in regulation of immune or inflammation responses). This was again true even at 2:1 charge ratio (see Figure 5). This plasmid has an approximate length of 5000 base pairs, determined on the basis of its comparative migration with the DNA ladder as reference. This result shows



Figure 5. Electrophoresis of dendrimer **1**/NfκB plasmid dendriplexes on 3% agarose gel: 1) (+)/(–)=2/1; 2) (+)/(–)=6/1; 3) (+)/(–)=10/1; 4) (+)/(–)=100/1; 5) and 6) plasmid only. Asterisk denotes 5000 bp DNA ladder as reference. The experiment was assayed three times.

that, regardless of the low generation, the carbosilane dendrimers have the capacity to bind large DNA molecules.

Finally, a preliminary study of the capacity of the dendriplex formed by **15** and the fluoresceinated ODN to penetrate into PBMCs was performed by confocal microscopy. Figure 6 shows the internalization and intracellular distribution of the nucleic material, with which the dendrimer does not seem to interfere. Research is in progress to elucidate the transfection process.

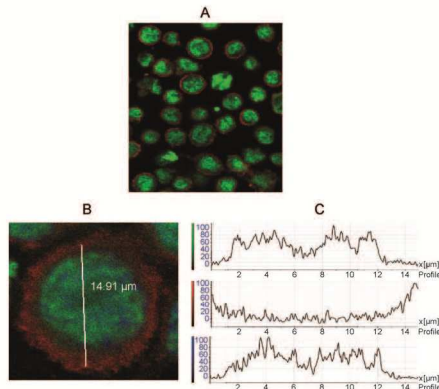


Figure 6. A) Confocal micrograph of internalization of **15**/ODN dendriplex after 48 h. B) Image of an isolated cell; white line denotes a section through the median plane XY. C) Plots of fluorescence emission through the section: green (fluoresceinated ODN), blue (cell nucleus) and red (cell membrane).

Conclusion

New families of amine- and ammonium-terminated carbosilane dendrimers have been synthesized by two strategies and fully characterized. The first entails alcoholysis of Si–Cl bonds by amino alcohols and subsequent quaternization with MeI. The second involves hydrosilylation of allylamine with Si–H bonds of dendrimers and subsequent quaternization with HCl. Quaternized carbosilane dendrimers are soluble in water, although degradation is apparent by hydrolysis of Si–O bonds. However, hydrolysis can be prevented or reduced, under very dilute conditions, by introduction of a rigid phenyl group as linker between the amino or ammonium groups and the Si–O bonds. Similarly, dendrimers containing Si–C bonds proved to be water-stable. For toxicity evaluation, distinct (but complementary) approaches were employed to evaluate membrane integrity, metabolic activity, apoptosis, morphology and cell movement. This approach allowed us to obtain a global picture of the potential toxic effects. Novel quaternized dendrimers of the second generation show good toxicity profiles in cell cultures over extended periods. Taking together the toxicity data for PBMCs and toxicity results for erythrocytes, the most biocompatible compound proved to be second-generation dendrimer **15**. Remarkably, in spite of their low generation, the carbosilane dendrimers are able to form complexes with DNA ODNs or even with plasmids by electrostatic interaction at biocompatible doses. In addition, the presence of Si–O bonds in the dendrimer architecture opens the way to use these dendritic macromolecules as drug delivery systems via an electrostatic approach with subsequent release by means of the hydrolytic process.

These results demonstrate that the new ammonium-terminated carbosilane dendrimers are a good base molecule to be considered for biomedical applications, such as drug carriers, controlled drug liberation (pH- or time-dependant, as in the case of **1**, **2**, and **15**), as antigen carriers or as vehicles for nucleic acids. Dendrimers **12** and **18** demonstrated very stable ODN binding, and hence they could be used to develop DNA-based devices such as microarrays.

The results of our biocompatibility and preliminary internalization assays highlight the possibility of developing transfection and immunomodulation experiments in PBMCs, and of studying the ability to interfere with the replication of pathogens such as viruses, bacteria or prions. These assays are currently being developed in our laboratories and will be the subject of future papers.

Experimental Section

General remarks: All manipulations of oxygen- or water-sensitive compounds were carried out under an atmosphere of argon using standard Schlenk techniques or an argon-filled glove box. Solvents were dried and freshly distilled under argon prior to use: hexane from sodium/potassium, toluene from sodium, tetrahydrofuran and diethyl ether from sodium benzophenone ketyl and dichloromethane over P_2O_5 . Unless otherwise stated, reagents were obtained from commercial sources and used as received.

$nG-(SiCl_3)_3$ and $nG-(SiH)_3$ dendrimers were prepared according to reported methods.^[17] Superfect (SF) is an activated PAMAM dendrimer with 140 terminal primary amino groups and $M=35000$ (Qiagen, Crawley, UK). G4 PAMAM dendrimer has $M=14215$ and 64 surface primary amino groups (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI).

1H , ^{13}C , and ^{29}Si NMR spectra were recorded on Varian Unity VXR-300 and Varian 500 Plus Instruments. Chemical shifts (δ , ppm) were measured relative to residual 1H and ^{13}C resonances for $CDCl_3$, $[D_6]DMSO$ and D_2O used as solvents, and ^{29}Si chemical shifts were referenced to external $SiMe_4$ (0.00 ppm). C, H and N analyses were carried out with a Perkin-Elmer 240 C microanalyzer. ESI and APCI samples were prepared in acetonitrile or methanol, and spectra were recorded on a Termoquest Finnigan Automass Multi Mass Spectrometer. MALDI-TOF MS samples were prepared in a 1,8,9-trihydroxyanthracene (dithranol) matrix, and spectra were recorded on a Bruker Reflex II spectrometer equipped with a nitrogen laser emitting at 337 nm and operated in the reflection mode at an accelerating voltage in the range 23–25 kV.

Synthesis of [3,5-(NMe₂CH₂CH₂O)₂](C₆H₅)CH₂OH (1**):** 2-Chloro-*N,N*-dimethylethylamine hydrochloride (2.98 g, 20.78 mmol), K_2CO_3 (6.43 g, 46.75 mmol), KI (1.72 g, 10.39 mmol), and [18]crown-6 (0.54 g, 2 mmol) were added to an acetone solution (100 mL) of 3,5-dihydroxybenzyl alcohol (1.47 g, 10.39 mmol). The reaction mixture was refluxed for 48 h and, after removal of the solvent, the residue was extracted with CH_2Cl_2/H_2O (2×50 mL). The organic layer was dried with $MgSO_4$, the resulting solution evaporated under reduced pressure, and the residue washed with hexane (2×10 mL) to give **1** as a pale yellow oil (1.53 g, 50%). 1H NMR ($CDCl_3$): $\delta=6.48$ (m, 2H; C₆H₅), 6.36 (m, 1H; C₆H₅), 4.57 (s, 2H; CH₂OH), 3.99 (t, 4H; CH₂OC₆H₅), 2.65 (t, 4H; CH₂N), 2.60 (s, 1H; CH₂OH), 2.28 ppm (s, 12H; NMe₂). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): $\delta=159.9$ (C₆H₅, C_{ipso} bonded to OCH₂CH₂NMe₂), 143.8 (C₆H₅, C_{ipso} bonded to CH₂OSi), 105.1, 100.6 (C₆H₅), 65.8 (CH₂OC₆H₅), 64.9 (CH₂OH), 58.2 (CH₂N), 45.8 ppm (NMe₂); elemental analysis calcd (%) for C₁₅H₂₀N₂O₃: C 63.80, H 9.28, N 9.92; found: C 63.50, H 9.17, N 9.83.

Synthesis of 1G-[Si(OCH₂(C₆H₅)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂)]₂ (3**):** A slight excess of NEt₃ (0.12 mL, 0.87 mmol) and 3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂-(C₆H₅)CH₂OH (0.22 g, 0.76 mmol) were added to a diethyl ether solution (50 mL) of first-generation chloro-terminated dendrimer 1G-Cl₄ (0.11 g, 0.19 mmol). The reaction mixture was stirred for 12 h at room temperature and then evaporated to dryness to remove residual NEt₃. The residue was extracted with Et₂O (50 mL) and filtered through Celite to remove the ammonium salt NEt₃·HCl. The resulting solution was evaporated under reduced pressure to give **3** as pale yellow oil (0.23 g, 80%). 1H NMR ($CDCl_3$): $\delta=6.45$ (m, 8H; C₆H₅), 6.36 (m, 4H; C₆H₅), 4.56 (s, 8H; CH₂OSi), 3.99 (t, 16H; CH₂OC₆H₅), 2.66 (t, 16H; CH₂N), 2.28 (s, 48H; NMe₂), 1.33 (m, 8H; SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0.68 (m, 8H; SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0.55 (m, 8H; SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0.08 ppm (s, 24H; SiMe₂). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): $\delta=159.8$ (C₆H₅, C_{ipso} bonded to OCH₂CH₂NMe₂), 143.2 (C₆H₅, C_{ipso} bonded to CH₂OSi), 104.9, 100.2 (C₆H₅), 65.9 (CH₂OC₆H₅), 64.6 (CH₂OSi), 58.2 (CH₂N), 45.8 (NMe₂), 21.2 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), 17.9, 17.2 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), -1.89 (SiMe₂); ^{29}Si NMR ($CDCl_3$): $\delta=0.49$ (G₁-Si), 18.7 ppm (G₁-Si); elemental analysis calcd (%) for C₆₀H₈₀N₈O₁₂Si₄: C 61.81, H 9.60, N 7.21; found: C 62.10, H 9.82, N 7.30.

Synthesis of 2G-[Si(OCH₂(C₆H₅)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂)]₂ (4**):** This dendrimer was prepared using a similar method to that described for **3**, starting from 2G-Cl₈ (0.27 g, 0.19 mmol), 3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂-(C₆H₅)CH₂OH (0.43 g, 1.52 mmol) and NEt₃ (0.22 mL, 1.62 mmol) to obtain compound **4** as a pale yellow oil (0.54 g, 82%). 1H NMR ($CDCl_3$): $\delta=6.45$ (m, 16H; C₆H₅), 6.36 (m, 8H; C₆H₅), 4.56 (s, 16H; CH₂OSi), 3.99 (t, 32H; CH₂OC₆H₅), 2.67 (t, 32H; CH₂N), 2.29 (s, 96H; NMe₂), 1.33 (m, 24H; SiCH₂CH₂CH₂SiO and SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.69 (m, 16H; SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0.55 (m, 32H; rest of CH₂ bonded to Si), 0.09 (s, 48H; OSiMe₂), -0.09 ppm (s, 12H; SiMe); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): $\delta=159.0$ (C₆H₅, C_{ipso} bonded to OCH₂CH₂NMe₂), 143.3 (C₆H₅, C_{ipso} bonded to CH₂OSi), 104.8, 100.1 (C₆H₅), 65.9 (CH₂OC₆H₅), 64.6 (CH₂OSi), 58.3 (CH₂N), 45.9 (NMe₂), 21.2 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), 17.9, 17.2 and overlapping signals (SiCH₂CH₂CH₂SiO and SiCH₂CH₂CH₂Si overlapping), -1.7 (OSiMe₂), -4.9 ppm (SiMe); ^{29}Si NMR ($CDCl_3$): $\delta=0.93$ (G₁-Si),

18.7 ppm (G₂-Si), G₃-Si was not observed; elemental analysis calcd (%) for C₁₇₆H₃₂₂N₁₆O₂₄Si₁₂: C 61.78, H 9.78, N 6.55; found: C 62.51, H 9.90, N 6.75; MALDI-TOF-MS: *m/z* 3422.1 [M+H]⁺ (calcd 3422.2).

Synthesis of 3G-[Si(OCH₂(C₆H₅)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂)₃] (5): This dendrimer was prepared using a similar method to that described for **3**, starting from 3G-Cl₃ (0.07 g, 0.02 mmol), 3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂-(C₆H₅)CH₂OH (0.10 g, 0.35 mmol) and NEt₃ (0.06 mL, 0.43 mmol) to obtain compound **5** as a pale yellow oil (0.11 g, 69%). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 6.46 (m, 32H; C₆H₅), 6.35 (m, 16H; C₆H₅), 4.56 (s, 32H; CH₂OSi), 3.97 (t, 64H; CH₂OC₆H₅), 2.67 (t, 64H; CH₂N), 2.28 (s, 192H; NMe₂), 1.33 (m, 56H; SiCH₂CH₂CH₂SiO and SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.69 (m, 32H; SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0.55 (m, 80H; rest of CH₂ bonded to Si), 0.09 (s, 96H; OSiMe₂), -0.09 ppm (s, 36H; SiMe); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 160.0 (C₆H₅, C_q bonded to OCH₂CH₂NMe₂), 143.2 (C₆H₅, C_q bonded to CH₂OSi), 104.3, 100.8 (C₆H₅), 65.9 (CH₂OC₆H₅), 64.6 (CH₂OSi), 58.3 (CH₂NMe₂), 45.8 (NMe₂), 21.1 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), 17.8, 17.2 and overlapping signals (SiCH₂CH₂CH₂SiO and SiCH₂CH₂CH₂Si overlapping), -1.8 (OSiMe₂), -4.9 ppm (SiMe); ²⁹Si NMR (CDCl₃): δ = 0.94 (G₁-Si and G₂-Si), 18.6 ppm (G₃-Si), G₃-Si was not observed; elemental analysis calcd (%) for C₃₆₈H₇₂₀N₉₆O₄₈Si₂₄: C 61.76, H 9.86, N 6.26; found: C 62.43, H 9.90, N 6.80.

Synthesis of 1G-[Si(O(CH₂)₂N(Me)(CH₂)₂NMe₂)₃] (6): This dendrimer was prepared using a similar method to that described for **3**, starting from 1G-Cl₃ (0.31 g, 0.54 mmol), 2-[[2-(dimethylamino)ethyl]methylamino]ethanol (0.35 mL, 2.16 mmol), and NEt₃ (0.5 mL, 3.58 mmol) to obtain compound **6** as a colorless oil (0.3 g, 57%). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 3.64 (t, 8H; CH₂O), 2.51 (m, 16H; CH₂N(Me)CH₂), 2.35 (t, 8H; CH₂NMe₂), 2.26 (s, 12H; NMe), 2.19 (s, 24H; NMe₂), 1.29 (m, 8H; SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0.62 (m, 8H; SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0.59 (m, 8H; SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0.05 ppm (s, 24H; SiMe); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 60.8 (CH₂O), 59.9, 56.2 (CH₂N(Me)CH₂), 57.5 (CH₂NMe₂), 45.9 (NMe₂), 43.3 (NMe), 21.2 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), 17.8 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), 17.2 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), -2.0 ppm (OSiMe₂); ²⁹Si NMR (CDCl₃): δ = 0.49 (G₁-Si), 17.59 ppm (G₂-Si); elemental analysis calcd (%) for C₆₄H₁₁₂N₈O₈Si₄: C 57.09, H 11.58, N 11.10; found: C 57.60, H 11.72, N 11.20.

Synthesis of 2G-[Si(O(CH₂)₂N(Me)(CH₂)₂NMe₂)₃] (7): This dendrimer was prepared using a similar method to that described for **3**, starting from 2G-Cl₃ (1.12 g, 0.77 mmol), 2-[[2-(dimethylamino)ethyl]methylamino]ethanol (1 mL, 6.16 mmol), and NEt₃ (1 mL, 7.17 mmol) to obtain compound **7** as a pale yellow oil (1.3 g, 72%). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 3.65 (t, 16H; CH₂O), 2.51 (m, 32H; CH₂N(Me)CH₂), 2.30 (t, 16H; CH₂NMe₂), 2.26 (s, 24H; NMe), 2.20 (s, 48H; NMe₂), 1.31 (m, 24H; SiCH₂CH₂CH₂SiO and SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.63 (m, 16H; SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0.59 (m, 32H; SiCH₂CH₂CH₂SiO), -0.10 ppm (s, 12H; SiMe); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 60.8 (CH₂O), 59.9, 56.2 (CH₂N(Me)CH₂), 57.5 (CH₂NMe₂), 45.9 (NMe₂), 43.3 (NMe), 21.2 (CH₂SiO), 18.7–17.9 (SiCH₂CH₂CH₂SiO and SiCH₂CH₂CH₂Si overlapping), -1.79 (OSiMe₂), -4.8 ppm (SiMe); ²⁹Si NMR (CDCl₃): δ = 0.38 (G₁-Si), 0.93 (G₂-Si), 17.58 ppm (G₃-Si); elemental analysis calcd (%) for C₁₁₂H₂₂₈N₁₆O₁₆Si₈: C 57.67, H 11.58, N 9.61; found: C 57.20, H 11.40, N 9.52; MALDI-TOF-MS: *m/z* 2332.8 [M+H]⁺ (calcd 2332.8).

Synthesis of 3G-[Si(O(CH₂)₂N(Me)(CH₂)₂NMe₂)₃] (8): This dendrimer was prepared using a similar method to that described for **3**, starting from 3G-Cl₃ (0.39 mL, 0.15 mmol), 2-[[2-(dimethylamino)ethyl]methylamino]ethanol (0.39 mL, 2.43 mmol) and NEt₃ (0.40 mL, 2.86 mmol) to obtain compound **8** as a pale yellow oil (0.51 g, 67%). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 3.65 (t, 32H; CH₂O), 2.51 (m, 64H; CH₂N(Me)CH₂), 2.36 (t, 32H; CH₂NMe₂), 2.26 (s, 48H; NMe), 2.21 (s, 96H; NMe₂), 1.30 (m, 56H; SiCH₂CH₂CH₂SiO and SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.63 (m, 32H; SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0.53 (m, 80H; rest of SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.06 (s, 96H; SiMe₂), -0.10 ppm (s, 36H; SiMe); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 60.8 (CH₂O), 60.0, 56.2 (CH₂N(Me)CH₂), 57.4 (CH₂NMe₂), 45.9 (NMe₂), 43.3 (NMe), 21.1 (CH₂SiO), 18.7–17.8 (SiCH₂CH₂CH₂SiO and SiCH₂CH₂CH₂Si overlapping), -1.9 (OSiMe₂), -4.8 ppm (SiMe); ²⁹Si NMR (CDCl₃): δ = 0.93 (G₁-Si and G₂-Si), 17.58 ppm (G₃-Si), G₃-Si not observed; elemental analysis calcd (%) for C₃₆₀H₇₂₀N₉₆O₄₈Si₂₄: C 57.91, H 11.58, N 9.00; found: C 57.32, H 11.38, N 8.72.

Synthesis of 1G-[Si(CH₂)₂NH₂]₃ (9): Allylamine (1.5 mL, 19.99 mmol) and two drops of Speier's catalyst were added to a solution of first-generation hydrogen-terminated dendrimer 1G-H₄ (0.54 g, 1.23 mmol) in the minimum amount of THF (1 mL). The reaction mixture was heated at 120 °C for 4 h and then evaporated to dryness to remove excess allylamine. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL) and filtered through Celite and active carbon to remove Pt. The resulting solution was evaporated under reduced pressure to give **9** as a colorless oil (0.23 g, 80%). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.63 (t, 8H; CH₂N), 1.34 (m, 16H; SiCH₂CH₂CH₂N and SiCH₂CH₂CH₂Si), 1.13 (s, 8H; NH₂), 0.54–0.44 (m, 24H; CH₂Si), -0.06 ppm (s, 24H; SiMe₂); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 45.7 (CH₂N), 28.3 (SiCH₂CH₂CH₂N), 20.2, 18.6, 17.6 (SiCH₂CH₂CH₂Si), 12.4 (SiCH₂CH₂CH₂N), -3.3 ppm (SiMe₂); ²⁹Si NMR (CDCl₃): δ = 0.50 (G₁-Si), 1.96 ppm (G₂-Si); elemental analysis calcd (%) for C₂₆H₄₈N₆Si₂: C 58.14, H 12.21, N 8.48; found: C 57.63, H 12.27, N 8.78; ESI MS: *m/z* 660.52 [M+H]⁺ (calcd 661.52).

Synthesis of 2G-[Si(CH₂)₂NH₂]₃ (10): This dendrimer was prepared using a similar method to that described for **9**, starting from 2G-H₆ (0.42 g, 0.36 mmol), allylamine (2 mL, 26.7 mmol) and two drops of Speier's catalyst to obtain compound **10** as a colorless oil (0.32 g, 55%). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 2.63 (t, 16H; CH₂N), 1.41–1.28 (m, 40H; SiCH₂CH₂CH₂Si and SiCH₂CH₂CH₂N), 0.54–0.44 (m, 64H; CH₂Si), -0.06 (s, 48H; SiMe₂), -0.10 ppm (s, 12H; SiMe); ¹³C NMR (CDCl₃): δ = 45.7 (CH₂N), 28.4 (SiCH₂CH₂CH₂N), 20.2, 18.6, 17.6 (SiCH₂CH₂CH₂Si), 12.5 (SiCH₂CH₂CH₂N), -3.1 (SiMe₂), -4.8 ppm (SiMe); ²⁹Si NMR (CDCl₃): δ = 0.92 (G₁-Si), 2.00 ppm (G₂-Si). The NMR data were assigned by analogy with the previously prepared model compound Et₃SiCH₂CH₂CH₂NH₂^{20d} elemental analysis calcd (%) for C₆₆H₁₉₈N₆Si₃: C 58.75, H 12.08, N 6.85; found: C 58.16, H 11.95, N 6.58; ESI MS: *m/z* = 1 not observed, *m/z* = 2: 818.44 [M/2 + H]⁺ (calcd 818.8). MALDI-TOF-MS: *m/z* 1636.3 [M+H]⁺ (calcd 1636.3).

Synthesis of 1G-[Si(OCH₂(C₆H₅)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂)₃] (11): A solution of MeI in Et₂O (2 mL, 0.35 mL, 0.70 mmol) was added to a diethyl ether (10 mL) solution of **3** (0.10 g, 0.06 mmol). The resulting solution was stirred for 48 h at room temperature and then evaporated under reduced pressure to remove residual MeI. The residue was washed with Et₂O (2 × 5 mL) and dried under vacuum to give **11** as a white solid (0.14 g, 90%). ¹H NMR ([D₂O]DMSO): δ = 6.55 (m, 12H; C₆H₅), 4.58 (s, 8H; CH₂OSi), 4.42 (t, 16H; CH₂OC₆H₅), 3.77 (t, 16H; CH₂N), 3.18 (s, 72H; NMe₂), 1.35 (m, 8H; SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0.70 (m, 8H; SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0.57 (m, 8H; SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0.08 ppm (s, 24H; SiMe₂); ¹³C NMR ([D₂O]DMSO): δ = 157.8 (C₆H₅, C_q bonded to OCH₂CH₂NMe₂), 143.2 (C₆H₅, C_q bonded to CH₂OSi), 104.9, 99.6 (C₆H₅), 63.5 (CH₂NMe₂), 63.0 (CH₂OSi), 61.3 (CH₂OC₆H₅), 52.7 (NMe₂), 19.9 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), 16.9, 16.1 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), -2.4 ppm (SiMe₂); elemental analysis calcd (%) for C₂₄H₁₇₂N₈O₁₂Si₄: C 39.29, H 6.44, N 4.17; found: C 38.90, H 6.24, N 4.09.

Synthesis of 2G-[Si(OCH₂(C₆H₅)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂)₃] (12): This dendrimer was prepared by a similar method to that described for **11**, starting from **4** (0.08 g, 0.023 mmol) and a solution of MeI in Et₂O (2 mL, 0.30 mL, 0.6 mmol). Compound **12** was isolated as a white solid (0.11 g, 85%). ¹H NMR ([D₂O]DMSO): δ = 6.58 (m, 24H; C₆H₅), 4.58 (s, 24H; CH₂OSi), 4.44 (t, 32H; CH₂OC₆H₅), 3.79 (t, 32H; CH₂N), 3.20 (s, 144H; NMe₂), 1.33 (m, 24H; SiCH₂CH₂CH₂SiO and SiCH₂CH₂CH₂Si overlapping), 0.67 (m, 24H; SiCH₂CH₂CH₂SiO), 0.54 (m, 32H; rest of CH₂ bonded to Si), 0.07 (s, 48H; OSiMe₂), -0.07 ppm (s, 12H; SiMe); ¹³C NMR ([D₂O]DMSO): δ = 157.9 (C₆H₅, C_q bonded to OCH₂CH₂NMe₂), 143.2 (C₆H₅, C_q bonded to CH₂OSi), 105.2, 99.6 (C₆H₅), 63.5 (CH₂NMe₂), 63.0 (CH₂OSi), 61.4 (CH₂OC₆H₅), 52.7 (NMe₂), 19.8 (SiCH₂CH₂CH₂SiO), 17.5, 16.8 and overlapping signals (SiCH₂CH₂CH₂SiO and SiCH₂CH₂CH₂Si overlapping), -2.4 (OSiMe₂), -5.5 ppm (SiMe); elemental analysis calcd (%) for C₁₉₂H₁₃₆₀N₁₆O₃₆Si₁₂: C 40.51, H 6.73, N 3.94; found: C 41.20, H 7.02, N 4.10.

Reaction of 3G-[Si(OCH₂(C₆H₅)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂)₃] (5) with MeI: The reaction of **5** with MeI by a similar method to that described for **11** afforded the dendrimer 3G-[Si(OCH₂(C₆H₅)-3,5-(OCH₂CH₂NMe₂)₂)₃] (13). However, the NMR analysis revealed that not all the amino groups were quaternized: roughly 85% of the groups were methylated

based on integration of the corresponding signal of the outer $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^-$ branch of the amino or ammonium groups. The NMR data of the quaternized branches are analogous to those given for dendrimer 12.

Synthesis of 1G- $[\text{Si}(\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{Me})(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_3^+\text{I}^-)]_4$ (14): This dendrimer was prepared using a similar method to that described for 11, starting from 6 (0.043 g, 0.047 mmol) and 0.095 mL of a 2 M solution in Et_2O of MeI (0.19 mmol). Compound 14 was isolated as a white solid (0.49 g, 95%). ^1H NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=3.61$ (t, 8H; OCH_2), 3.47 (t, 8H; $\text{CH}_2\text{NMe}_3^+$), 3.11 (s, 36H; NMe_3^+), 2.76 (t, 8H; $\text{N}(\text{Me})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+\text{I}^-$), 2.49 (t, 8H; $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.22 (s, 12H; NMe), 1.30 (m, 8H; $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0.61 (m, 8H; $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0.53 (m, 8H; $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0.04 ppm (s, 24H; OSiMe_2); ^{13}C NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=61.1$, 59.5, 58.3, 50.9 (methylene groups of $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Me})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+$), 52.2 (NMe_3^+), 41.3 (NMe), 20.0 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 16.9, 16.1 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), -2.5 ppm (OSiMe_2).

Synthesis of 2G- $[\text{Si}(\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{Me})(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_3^+\text{I}^-)]_8$ (15): This dendrimer was prepared by a similar method to that described for 11, starting from 7 (0.19 g, 0.08 mmol) and a solution of MeI in Et_2O (2 M, 0.34 mL, 0.64 mmol). Compound 15 was isolated as a white solid (0.49 g, 95%). ^1H NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=3.60$ (t, 16H; OCH_2), 3.42 (t, 16H; $\text{CH}_2\text{NMe}_3^+$), 3.11 (s, 72H; NMe_3^+), 2.76 (t, 16H; $\text{N}(\text{Me})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+$), 2.49 (t, 16H; $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.22 (s, 24H; NMe), 1.30 (m, 24H; $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$ and $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.59 (m, 16H; $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0.51 (m, 32H; rest of CH_2Si groups), 0.03 (s, 48H; OSiMe_2), -0.11 ppm (s, 12H; SiMe); ^{13}C NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=61.0$ ($\text{CH}_2\text{NMe}_3^+$), 59.6 (OCH_2), 58.3 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 52.3 (NMe_3^+), 50.9 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+$), 41.3 (NMe), 20.0–16.8 (CH_2 groups of the carbosilane skeleton), -2.5 (OSiMe_2), -5.5 ppm (SiMe).

Synthesis of 3G- $[\text{Si}(\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{Me})(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_3^+\text{I}^-)]_{16}$ (16): This dendrimer was prepared by a similar method to that described for 11, starting from 8 (0.084 g, 0.017 mmol) and a solution of MeI in Et_2O (2 M, 0.13 mL, 0.27 mmol). Compound 16 was isolated as a white solid (0.49 g, 95%). ^1H NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=3.60$ (t, 32H; OCH_2), 3.44 (t, 32H; $\text{CH}_2\text{NMe}_3^+$), 3.12 (s, 144H; NMe_3^+), 2.76 (t, 32H; $\text{N}(\text{Me})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+$), 2.49 (t, 32H; $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.22 (s, 48H; NMe), 1.28 (m, 36H; $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$ and $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.51 (m, 112H; $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$ and $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.03 (s, 96H; OSiMe_2), -0.11 ppm (s, 36H; SiMe); ^{13}C NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta=61.0$ ($\text{CH}_2\text{NMe}_3^+$), 59.6 (OCH_2), 58.3 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 52.3 (NMe_3^+), 50.8 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+$), 41.3 (NMe), 20.0–16.8 (CH_2 groups of the carbosilane skeleton), -2.5 (OSiMe_2), -5.5 ppm (SiMe).

Synthesis of 1G- $[\text{Si}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3^+\text{Cl}^-]_4$ (17): A solution of HCl in Et_2O (1 M, 1.2 mL, 1.2 mmol) was added to a diethyl ether (40 mL) solution of 9 (0.17 g, 0.26 mmol). The resulting solution was stirred for 2 h at room temperature and then evaporated under reduced pressure to give 17 as a white solid in a quantitative yield. ^1H NMR (D_2O): $\delta=2.74$ (t, 8H; CH_2N), 1.45 (m, 8H; $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.19 (m, 8H; $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.38 (m, 24H; CH_2Si), -0.19 ppm (s, 24H; SiMe_2); ^{13}C NMR (D_2O): $\delta=42.0$ (CH_2N), 21.3 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 18.8, 18.0, 16.6 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 11.2 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), -4.4 ppm (SiMe_2); elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{Cl}_4\text{Si}_4$: C 47.61, H 10.49, N 6.94; found: C 48.57, H 10.46, N 6.82.

Synthesis of 2G- $[\text{Si}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3^+\text{Cl}^-]_8$ (18): This dendrimer was prepared by a similar method to that described for 17, starting from 10 (0.09 g, 0.05 mmol) and a solution of HCl in Et_2O (1 M, 0.6 mL, 0.6 mmol). Compound 18 was isolated as a white solid (0.06 g, 55%). ^1H NMR (D_2O): $\delta=2.74$ (t, 16H; CH_2N), 1.47 (m, 16H; $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.16 (m, 24H; $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.39 (m, 64H; CH_2Si), -0.16 (s, 48H; SiMe_2), -0.25 ppm (s, 12H; SiMe); ^{13}C NMR (D_2O): $\delta=42.6$ (CH_2N), 21.8 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 20.5–17.0 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 12.1 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), -3.23 (SiMe_2), -4.17 ppm (SiMe); elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{40}\text{H}_{80}\text{N}_8\text{Cl}_8\text{Si}_8$: C 49.86, H 10.67, N 5.81; found: C 49.79, H 10.18, N 5.76.

PBMCs and oligonucleotide: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were derived from healthy voluntary donors, and obtained from leukophoresed blood by Ficoll gradient and elutriation centrifugation. The ODN sequence was 18 bases long and corresponded to an anti-

sense (complementary) sequence of the HIV polypurine tract (PPT) element mRNA: 5'-fluoresceine-AAT TTT CTT TTC CCC CCT-3'. For treatment of PBMCs and oligonucleotide synthesis, see Supporting Information.

Formation of ODN/dendrimer complexes: Complex formation between dendrimers and ODNs was performed by an electrostatic approach. Ratios of ODN to dendrimer were based on the calculation of the electrostatic charge present on each component, for example, the number of phosphate groups in the ODN versus the number of terminal ammonium groups on the dendrimer. Dendrimers were diluted in sterile distilled water at 2 mg mL $^{-1}$. The ODN concentration for complexes with carbosilane dendrimers was 0.88 μM (2.57 μg), and for complexes with SF 0.34 μM (1 μg); the concentrations of the dendrimers were 3.93 μM (2.96 μg) for 1, 1.99 μM (2.35 μg) for 2, 1.96 μM (2.80 μg) for 12, 3.94 μM (3.42 μg) for 15, 3.98 μM (1.92 μg) for 18 and 0.68 μM for SF (final concentration in well). All complexes were formed in 60 μL of serum-free RPMI medium, with an incubation time of 20 min at room temperature. The concentration of DNA and SF in the complex was chosen according to the manufacturers instructions. In the same way, complexes between ODN and SF were formed according to these instructions.

Evaluation of ODN/dendrimer complex formation: Complex formation was assessed by evaluation of migration retardation of fluoresceinated ODNs or alternatively NF- κ B plasmid during electrophoresis on 3% agarose gels. A 100 or 5000 bp DNA ladder was used respectively as reference (Gibco BRL).

pH gradient: To check stability of dendriplexes at different pH values, we employed different phosphate and acetate buffer solutions. For acid extreme of pH 2.8 an acidic solution (0.05 M glycine/HCl/0.1 M NaCl) was used.

Phase-contrast light microscopy: After incubation with dendrimers, changes in morphology and characteristics of PBMCs, such as cell membrane birefringence, were observed through a phase-contrast inverted microscope (Nikon TMS, Nikon, Japan) equipped with a 100X objective (Plan 10/0.30DL/Ph1, Nikon, Japan). Live PBMCs are bright, with a defined spherical shape, and float in the culture medium. Dead cells have a darker appearance and are mostly present in the bottom of the well. In addition, we assessed the presence or absence of cell aggregation.

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay: This method was selected to analyze detrimental intracellular effects on mitochondria and metabolic activity. The colorimetric MTT test, based on the selective ability of viable cells to reduce MTT to purple formazan, relies on intact metabolic activity and is frequently used for cytotoxicity screening. After 48 h of incubation of PBMCs with different concentrations of dendrimers in a 96-well plate, culture medium containing the dendrimers was replaced with 200 μL of serum-free OptiMem. 20 μL of sterile, filtered MTT (Sigma) stock solution in PBS (pH 7.4, 5 mg mL $^{-1}$) was added to each well to achieve a final concentration of 0.5 mg MTT per millilitre. After 4 h, unconverted dye was removed by aspiration and the formazan crystals were dissolved in dimethyl sulfoxide (200 μL per well; Merck, Darmstadt, Germany). The concentration of formazan was then determined spectrophotometrically in a plate reader at a wavelength of 570 nm (test) and 690 nm (reference). The spectrophotometer was calibrated to zero absorbance by using OptiMem medium without cells. The percentage cell viability relative to control wells (cells with no dendrimer) was calculated by $([A]_{\text{test}}/[A]_{\text{control}}) \times 100$. Each dendrimer concentration was tested in triplicate, according to American Type Culture Collection (ATCC) directives.

Hemolysis test: The hemolytic and hemagglutinating activity of the carbosilane dendrimers was evaluated according to Pamham and Wetzig $^{[25]}$ and compared with that induced by a 4G PAMAM dendrimer. Erythrocytes were obtained from the bottom of the tube after PBMC extraction following blood centrifugation in Ficoll gradient. Erythrocytes were diluted with cold PBS (pH 7.4) to a convenient volume to make feasible their visualisation. This suspension of red blood cells was always freshly prepared and used within 24 h after collection. Carbosilane dendrimer solutions of different concentrations, also prepared in PBS buffer, were added to erythrocytes and were incubated for 60 min at 37°C in a shaking water bath. The presence/absence of hemagglutination was observed

under a phase-contrast inverted microscope. In a second step, the release of hemoglobin was determined after centrifugation (1500 rpm) by photometric analysis of the supernatant at 540 nm. Complete hemolysis was achieved with 0.2% Triton X-100 to give the 100% control value. Less than 10% hemolysis was regarded as no-toxic-effect level in our experiments. The experiments were run in triplicate and were repeated twice.

Lymphoproliferative assay: PBMCs were incubated for one week with two different concentrations of each dendrimer in a 96-well plate (100000 cells per well seeded in 200 μ L of complete RPMI medium with antibiotics, glutamine, and 10% of human AB serum). A well with untreated cells was included along with a positive control for proliferation (cells treated with 1 μ g mL⁻¹ of phytohemagglutinin). PBMC proliferation was evaluated by incorporation of [³H]thymidine into DNA during the last 16 h of culture. The cells were pulsed with 1 μ Ci of [³H]thymidine and harvested in glass-fiber filters by using an automatic cell harvester, and radioactivity incorporation was measured in a liquid scintillation spectrometer. The assay was carried out for triplicate cultures.

Flow cytometry (FC): Dead or dying cells were identified by their typical diminished forward (FW) and increased side (SD) light-scattering characteristics. In the FC analysis of PBMCs treated with the different dendrimers, we drew a gate around cells presenting FW and SD corresponding to live cells and another one around cells showing FW and SD of dead or dying cells. We then compared the percentage of cells included in the two gates. Cells with FW and SD corresponding to monocytes (less than 5%) were not included in the analysis. FC was performed in a Beckmann-Coulter flow cytometer.

Trypan Blue (TB) uptake: TB dye is excluded by viable cells but can penetrate cell membranes of dying or dead cells. When TB staining is negative, membrane integrity is present. Cells were treated with 0.6% TB (Sigma) for 5 min and then washed twice with PBS. At least 200 cells were counted under the microscope for each condition.

Microscopy

DAPI labeling: Cells were seeded on glass slides coated with Poly-L-lysine, fixed with 4% paraformaldehyde and treated with DAPI for 10 min. They were then washed three times with PBS and observed under a Leica TCS SP2 confocal microscope with excitation at 405 nm.

Time-lapse in vivo imaging: After 72 h of incubation with dendrimers or dendriplexes, cells were seeded in special chambers for in vivo microscopy at 37°C and 5% CO₂. One image was captured every 30 s over a period of 10 min. A time-lapse video was prepared from the images, and cell viability and motility were examined.

Acknowledgements

We thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project CTQ2005-00795/BQU), the DGI-Comunidad de Madrid (Project GR/MAT/0733/2004), the Plan Nacional de Salud (grant SAF-2004-06778, SAF-2003-09209), the Red Temática Cooperativa de investigación en sida y genética (grant RIS G03/173 and grant RIG C03/07, respectively) of Fondos de Investigación Sanitaria (FIS), FIPSE (36514/05), the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (grant BQU2004-02048), and Fundación LA CAIXA (BM04-S2-0) for financial support. J.F.B. is supported by a grant of Fondos de Investigación Sanitaria Madrid (CM04/00136). The Leica TCS SP2 confocal microscope was acquired with the grants donated by the "Fondo de Investigaciones Sanitarias" to the "Fundación para la Investigación del Hospital Gregorio Marañón", Madrid. R.S. is supported by "Fondo de Investigaciones Sanitarias" (FIS-CA05/0043).

- [1] a) M. Fischer, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 934–955; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 884–905, and references therein. b) *Dendrimers and other Dendritic Polymers* (Eds.: J.M. Fréchet, D.A. Tomalia), Wiley Series in Polymer Science, Wiley, New York, **2001**; c) *Dendrimers and Dendrons: Concepts, Syntheses, Applications* (Eds.: G.R. Newkome, C.N. Moorefield, F. Vögtle), Wiley-VCH, Weinheim, **2001**; d) G.E. Ossterom, J.N.H. Reek, P.C.J. Kamer,

- P.W.N.M. van Leeuwen, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1878–1901; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1828–1849; e) D. Astruc, F. Char-dac, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2991–3023; f) S.M. Grayson, J.M.J. Fréchet, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3819–3867; g) S.E. Stiriba, H. Frey, R. Haag, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1385–1390; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1329–1334; h) F. Aulenta, W. Hayes, S. Rannard, *Eur. Polym. J.* **2003**, *39*, 1741–1771; i) U. Boas, P.M.H. Heegaard, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43–63; j) S. Svenson, D.A. Tomalia, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 2106–2129.
- [2] S. Haccin-Bey-Abina, C. von Kalle, M. Schmidt, F. Le Deist, N. Wulffraat, E. McIntyre, I. Radford, J.L. Villeval, C.C. Fraser, M. Cavazzana-Calvo, A. Fischer, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 255–256.
- [3] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 7413–7417.
- [4] G. McLachlan, B.J. Stevenson, D.J. Davidson, D.J. Porteous, *Gene Ther.* **2000**, *7*, 384–392.
- [5] T.V. Chirila, P.E. Rakoczy, K.L. Garrett, X. Lou, I.J. Constable, *Biomaterials* **2002**, *23*, 321–342.
- [6] J. Haensler, F.C. Szoka, Jr., *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 372–379.
- [7] For some examples, see: a) A.U. Bielinska, C. Chen, J. Johnson, J.R. Baker, Jr., *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 843–850; b) J. Dennig, E. Duncan, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 339–347; c) J. Dennig, *Top. Curr. Chem.* **2003**, *228*, 227–236.
- [8] M.X. Tang, C.T. Redemann, F.C. Szoka, Jr., *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 703–714.
- [9] a) C. Loup, M.A. Zanta, A.M. Caminade, J.P. Majoral, B. Meunier, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 3644–3650; b) A.M. Caminade, J.P. Majoral, *Progr. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 491–505.
- [10] B.H. Zinselmeyer, S.P. Mackay, A.G. Schatzlein, I.F. Uchegbu, *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 960–967.
- [11] a) T. Nidome, M. Wakamatsu, A. Wada, T. Hirayama, H. Aoyagi, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 271–279; b) M. Ohsaki, T. Okuda, A. Wada, T. Hirayama, T. Nidome, H. Aoyagi, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 510–517.
- [12] N. Malik, R. Wiwattanapatapee, K. Klopsch, K. Lorenz, H. Frey, J.W. Weener, E.W. Meijer, W. Paulus, R. Duncan, *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 133–148.
- [13] S.W. Kraska, D. Seyferth, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3604–3612.
- [14] B. Lühmann, H. Lang, K. Brünig, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2001**, *168*, 481–484.
- [15] A.W. Kleij, R. van de Coevering, R.J.M. Klein Gebbink, A.M. Noordman, A.L. Spek, G. van Koten, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 181–192.
- [16] P. Ortega, J.F. Bermejo, L. Chonco, E. de Jesús, F.J. de la Mata, G. Fernández, J.C. Flores, R. Gómez, M.J. Serranía, M.A. Muñoz-Fernández, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 1388–1396.
- [17] a) A.W. van der Made, P.W.N.M. van Leeuwen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 1400–1401; b) A.W. van der Made, P.W.N.M. van Leeuwen, J.C. de Wilde, R.A.C. Brandes, *Adv. Mater.* **1993**, *5*, 466–468; c) L.L. Zhou, J. Roovers, *Macromolecules* **1993**, *26*, 963–968; d) D. Seyferth, D.Y. Son, A.L. Rheingold, R.L. Ostrander, *Organometallics* **1994**, *13*, 2682–2690; e) I. Cuadrado, M. Morán, J. Losada, C.M. Casado, C. Pascual, B. Alonso, F. Lobete in *Advances in Dendritic Macromolecules*, Vol. 3 (Ed.: G.R. Newkome), JAI press Inc., Greenwich, CT, **1996**, pp. 151–195.
- [18] a) J.L. Speier, J.A. Webster, G.H. Barnes, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 974–979; b) R.A. Benkeser, J. Kang, *J. Organomet. Chem.* **1980**, *185*, C9–C12.
- [19] a) R. Jevprasesphant, I. Penny, R. Jalal, D. Attwood, N.B. McKeown, A.D'Emanuele, *Int. J. Pharm.* **2003**, *252*, 263–266; b) D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, *Biomaterials* **2003**, *24*, 1121–1131.
- [20] M. Maszewska, J. Leclaire, M. Cieslak, B. Nawrot, A. Okruszek, A.M. Caminade, J.P. Majoral, *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 193–205.
- [21] a) A. Bielinska, J.F. Kukowaska-Lantallo, J. Johnson, D.A. Tomalia, J.R. Baker, Jr., *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2176–2182; b) H. Yoo, R.L. Juliano, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 4225–4231.

- [22] M. A. Kostiainen, J. G. Hardy, D. K. Smith, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2612–2615; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2556–2559.
- [23] R. Göller, J. P. Vors, A. M. Caminade, J.-P. Mayoral, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3587–3590.
- [24] Synthesis of $\text{Et}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$: Et_3SiH was added to neat allylamine in the presence of Speier catalyst. Selected data for $\text{Et}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$: ^1H NMR (CDCl_3): $\delta=2.62$ (t, 2H; CH_2N), 1.59 (s, 2H; NH_2), 1.35 (m, 2H; $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 0.87 (t, 9H; CH_3CH_3), 0.46 ppm (m, 8H; CH_2Si and CH_2CH_3); ^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta=45.6$ (CH_2N), 27.9 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 8.3 (CH_3Si), 7.4 (CH_3CH_3), 3.2 ppm (CH_2CH_3).
- [25] M. J. Parnham, H. Wetzig, *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64*, 263–274.

Received: April 28, 2006
Published online: September 27, 2006

Water-soluble carbosilane dendrimers protect phosphorothioate oligonucleotides from binding to serum proteins

Louis Chonco,^a Jesus F. Bermejo-Martín,^a Paula Ortega,^b Dzmityr Shcharbin,^d Elzbieta Pedziwiatr,^d Barbara Klajnert,^d F. Javier de la Mata,^{*b} Ramon Eritja,^c Rafael Gómez,^{*b} Maria Bryszewska^{*d} and M^a Angeles Muñoz-Fernandez^{*a}

Received 16th March 2007, Accepted 27th April 2007

First published as an Advance Article on the web 14th May 2007

DOI: 10.1039/b703989a

Treatment of dendriplexes formed between water-soluble carbosilane dendrimers and phosphorothioate oligodeoxynucleotides (ODN) with the anionic detergent sodium dodecyl sulfate disrupted the complexes indicating that the nature of the union in such dendriplexes is merely electrostatic. However, dendriplexes were not dissociated by serum proteins like bovine or human serum albumins, as assessed by gel electrophoresis and fluorescence experiments. This would imply a dendrimer-mediated protective effect able to prevent ODN interactions with serum proteins and additionally could translate into a reduction of the ODN doses needed to achieve the biological effects. The employment of carbosilane dendrimers as carriers may solve the problem of ODN kidnapping by plasmatic proteins as a key drawback for therapeutics involving ODNs. As examples, transfection processes on normal primary peripheral blood cells and diagnosis of HIV infection in the presence of serum have been assayed.

Introduction

In the last few years, many anti-viral drugs have been developed to fight HIV infection, and proven to control infection. However, many phase II and III trials have reported severe side effects (*i.e.*, liver toxicity), but particularly the emergence of drug-resistant strains. Moreover, all the current therapies do not reach all target cells (*i.e.*, inside tissues and the central nervous system) and are not able to eradicate latently infected cells.¹ The existence of viral reservoirs makes viral eradication nearly impossible with the drugs available to date. All of this makes necessary the development of new alternative therapeutic approaches to achieve better efficiency with less adverse effects. Gene therapy (GT) represents one of those new therapeutic approaches. However, GT is undergoing some troubles due to the problems that viral vectors present as vehicles for delivery of nucleic acids.² For instance, the use of viral vectors suffers from adverse effects, such as immune reaction against the viral vector or lymphoproliferative syndromes associated with oncogene deregulation. Besides, the consequences of the incorporation of non-human genetic material into human cells are still difficult to predict. An additional problem is the oligonucleotides' tendency to bind non-specifically to serum proteins that decreases their bioavailability, making necessary higher doses for accomplishing a desired therapeutic effect. In some cases, such non-specific binding to proteins can induce toxic effects,

especially for the phosphorothioate oligodeoxynucleotide (ODN) derivatives.³ Bovine serum albumin (BSA) and human serum albumin (HSA) bind ODNs, inducing their uptake by cells of the reticulo-endothelial system and not allowing them to reach the extravascular space. Serum protein binding to ODN avoids thus the overall interaction of oligonucleotides with cells.^{3a,4} Several other proteins also bind ODNs, and the physiological state of the cell influences the binding patterns.⁵ Some strategies have been proposed to avoid ODN binding to serum proteins, for instance, the use of vehicles such as cationic lipid carriers (lipoplexes)⁶ or dendrimers (dendriplexes).⁷ One of the crucial impediments for successful systemic ODN or DNA transfer with lipoplex exhibiting a positive global charge, seems to be their inactivation because of the non-specific binding of such liposomes with anionic serum proteins⁸ as well as side-effects like lung inflammatory reactions.⁹ Dendrimers emerge as an alternative approach to liposomes and polymeric systems for drug delivery. Their major advantages are the uniform structure, multiple sites of attachment and the versatility to modify their skeletons and surfaces, allowing a precise characterization of the interaction of dendrimer–drug. Potential transfecting agents based on PAMAM,¹⁰ phosphorus-containing¹¹ dendrimers or some small amphiphilic dendrimers¹² have shown transfecting activity even in the presence of serum. Although several studies have been published concerning the interaction between PAMAM dendrimers and BSA,¹³ however, as far as we know, there is only one study reporting on the interaction between PAMAM-containing dendriplexes and serum proteins.¹⁴

Water-soluble carbosilane dendrimers containing ammonium or amine groups at their periphery have been recently described by our groups as biocompatible molecules with good perspectives as non-viral carriers for ODN.¹⁵ In this work, we describe the interactions between albumin and the dendriplexes formed between ODN and second generation carbosilane dendrimers having ammonium groups at their periphery (see Fig. 1) by gel

^aLaboratorio de Inmunobiología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

^bDepartamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá, Campus Universitario, E-28871, Alcalá de Henares, Spain. E-mail: Rafael.Gomez@uah.es; Fax: (+34) 91 8854683; Tel: (+34) 91 8854685

^cInstituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Jordi Girona, Barcelona, Spain

^dDepartment of General Biophysics, University of Łódź, Łódź, 90-237, Poland

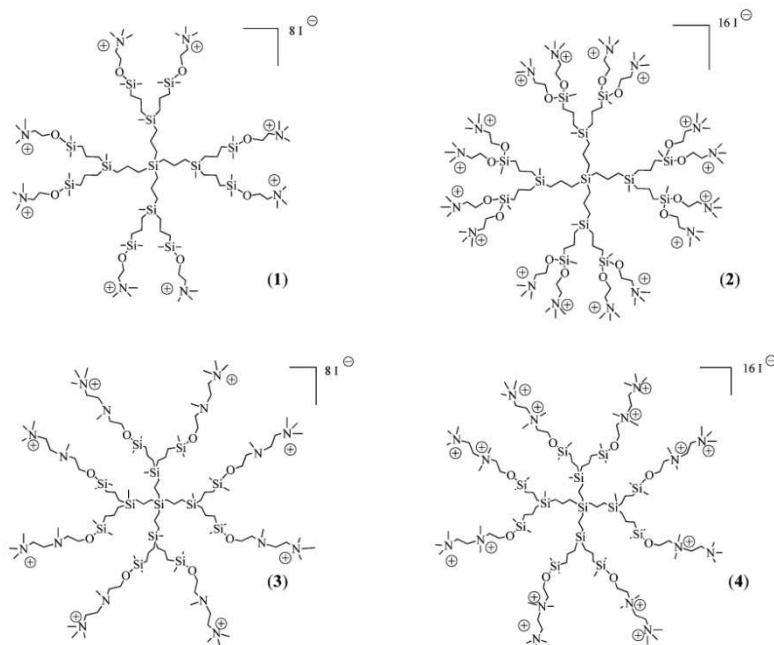


Fig. 1 Molecular representation of the ammonium-terminated carbosilane dendrimers 1–4.

electrophoresis and fluorescence spectroscopy. Here we prove a dendrimer-mediated protection of ODNs from binding to serum proteins to evaluate their use in some biomedical applications for HIV infection research.

Results and discussion

We have published that second generation ammonium-terminated carbosilane dendrimers have shown good toxicity profiles in PBMCs primary cell culture models and erythrocytes over extended periods, employing different approaches such as evaluation of cell membrane integrity, metabolic activity, apoptosis induction, cellular morphology, and cell mobility.^{15b} In addition, the existence of Si–O bonds in their architecture opens the way to use them as drug delivery system by means of the corresponding hydrolytic process. Dendrimers $2G-[Si(OCH_2CH_2NMe_3^+I^-)]_k$ (1), $2G-[Si(OCH_2CH_2NMe_3^+I^-)]_k$ (2) and $2G-[Si(OCH_2)_2N(Me)(CH_2)_2NMe_3^+I^-]_k$ (3) were prepared according to the reported methods.¹⁵ Dendrimer $2G-[Si(OCH_2)_2N(Me)_2(CH_2)_2NMe_3^+I^-]_k$ (4) containing 8 groups of doubled methylated outer fragments was prepared by addition of 16 equivalents of MeI to the corresponding amine-terminated dendrimer $2G-[Si(OCH_2)_2N(Me)(CH_2)_2NMe_3^+I^-]_k$ ¹⁵ (see Experimental section). Dendrimer 4 exhibits similar toxicity profiles to those shown

by dendrimer 3. The structures of the all dendrimers used in this work are depicted in Fig. 1. First generation dendrimers were too water-sensitive for chemical evaluation while those of the third generation were not tested due to solubility problems. These features precluded data rationalization on the basis of different generations.

Dendriplexes were prepared as published elsewhere.^{15b} Phosphorothioate ODNs used for binding studies were PPT and TAR, 15 or 16 bases in length respectively (see Experimental section) and both ODNs showed identical behaviour. The interaction of the dendriplexes, formed by dendrimers 1–4 and ODNs, with BSA has been studied by agarose gel electrophoresis showing no dissociation of the complexes in any case as is shown in Fig. 2. For a more detailed study, dendriplex 3-ODN was chosen as an example. The interactions of dendriplex 3-ODN with BSA and with the anionic detergent sodium dodecyl sulfate (SDS) have been studied by electrophoresis (see Fig. 3). The electrophoregram showed different patterns of migration depending on the agent used. ODN migration was retarded in the presence of BSA (see entry 9) as indirect evidence of the formation of a complex between ODN and proteins. The ODN migration pattern was also altered in the presence of dendrimer 3 (entry 1) due to the formation of a complex between the cationic dendrimer and the anionic ODN as had been expected.¹³ Interestingly, when the dendriplexes

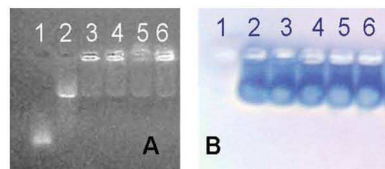


Fig. 2 (A) Electrophoresis on a 3% agarose gel (stained with ethidium bromide) of dendriplex formed by different carbosilane dendrimers and TAR ODN in a ratio (+)(-) 2 : 1 in the presence of increasing concentrations of BSA. (B) The same gel stained with Blue Paragon showing the protein migration. (1) ODN; (2) ODN + 10% BSA; (3) 1-ODN + 10% BSA; (4) 3-ODN + 10% BSA; (5) 2-ODN + 10% BSA; (6) 4-ODN + 10% BSA.

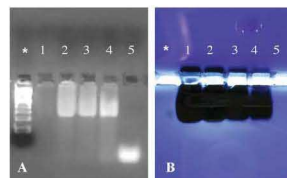


Fig. 4 (A) Electrophoresis on a 3% agarose gel (stained with ethidium bromide) of ODN (TAR) in the absence or presence of increasing concentrations of AB human serum. (B) The same gel stained with Blue Paragon showing the protein migration. * denotes 100 bp DNA ladder as reference; (1) AB human serum; (2) ODN + 20% AB; (3) ODN + 10% AB; (4) ODN + 5% AB; (5) ODN.

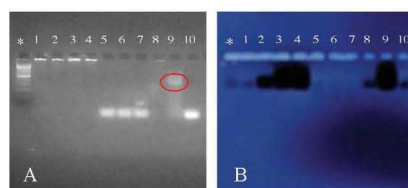


Fig. 3 (A) Electrophoresis on a 3% agarose gel (stained with ethidium bromide) of dendrimer 3, ODN (TAR) or dendriplex 3-ODN in a ratio (+)(-) 2 : 1 in the absence or presence of increasing concentrations of BSA or SDS. (B) The same gel stained with Blue Paragon showing the protein migration. * denotes 100 bp DNA ladder as reference; (1) 3-ODN; (2) 3-ODN + 2% BSA; (3) 3-ODN + 5% BSA; (4) 3-ODN + 10% BSA; (5) 3-ODN + 0.5% SDS; (6) 3-ODN + 1% SDS; (7) 3-ODN + 2% SDS; (8) 3-ODN + RPMI 1640 supplemented with serum (10% FCS); (9) ODN + 10% BSA; (10) ODN.

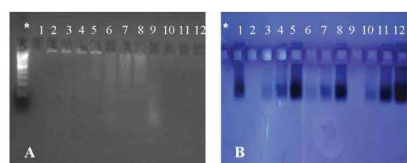


Fig. 5 (A) Electrophoresis on a 3% agarose gel (stained with ethidium bromide) of dendrimer 3, ODN (PPT) or dendriplex 3-ODN in a ratio (+)(-) 2 : 1 in the absence or presence of increasing concentrations of AB human serum. (B) The same gel stained with Blue Paragon showing the protein migration. * denotes 100 bp DNA ladder as reference; (1) 20% AB human serum; (2) 3-ODN; (3) 3-ODN + 5% AB; (4) 3-ODN + 10% AB; (5) 3-ODN + 20% AB; (6) ODN + 5% AB; (7) ODN + 10% AB; (8) ODN + 20% AB; (9) ODN; (10) 3 + 5% AB; (11) 3 + 10% AB; (12) 3 + 20% AB.

3-ODN were challenged with increasing concentrations of BSA, no changes in this migratory pattern were found (see entries 2–4) proving that under these conditions, BSA was not able to dissociate the complex. However, the treatment with SDS in all the tested concentrations disrupted the complex, allowing the ODN to be electrophoresed and analyzed by its mobility in the gel (entries 5–7), also indicating that the nature of the complex union is based on electrostatic interactions.

Further studies were conducted to evaluate ODN interactions with proteins of AB human serum when the ODNs were naked or alternatively complexed with dendrimers. Fig. 4 shows the results of interactions between ODN and proteins of human serum. Entries 2–4 clearly show the half migration of the ODN in the presence of human AB serum with respect to the ODN alone (entry 5). These results reveal the ODN union to human serum proteins, which is confirmed by the migration pattern of the proteins (see Fig. 4B): proteins and ODN migrated at the same level. Regarding the dendriplex 3-ODN, this was incubated for 20 min prior to the addition of increasing amounts of serum (see Fig. 5). When the dendriplex 3-ODN was challenged with increasing concentrations of human AB serum, no changes in this migratory pattern were found. ODN did not migrate towards the positive pole (entries 3–5) and at the same time, the pattern of

protein migration was just the same as that displayed by proteins of the control (absence of ODN and dendrimer, entry 1) and the same as the one exhibited by proteins in the presence of ODN (entries 6–8) or dendrimers (entries 10–12). These features indicate again a protective effect of the dendrimer towards ODN from binding to serum proteins. Only in the dendriplex challenged with 20% of total serum (entry 5), a slight change in the ODN migration was observed: most of the ODN did not migrate but a small part did, to an intermediate position, similar to the pattern shown for ODN in the presence of serum (entries 6–8). This could be a consequence of the competition between dendrimer and serum proteins for the ODN, resulting partially in ODN releasing from the ODN–dendrimer complex and further formation of the ODN–protein complex when a high concentration of proteins is present in the medium. Finally, dendrimers without ODN did not change the migratory pattern of the proteins, evidencing no interactions between them, although a weak electrostatic interaction cannot be ruled out (*vide infra*). Serum albumin has a net negative charge but it is not uniformly charged within the structure and, at physiological pH, domains I and II are negatively ionized while domain III is weakly positively charged. Hence, the ODN can interact with this domain III enabling the formation of a complex between albumin and ODN. In the case of ammonium-terminated dendrimers, they may theoretically interact with both domains I

and II. The interacting ability of PAMAM with albumin has been reported^{15,16} and due to the low isoelectric point of albumin, it interacts better with low protonated dendrimers than with the highly protonated ones. The poor interaction of PAMAM with albumin may indicate that the less polar sites of the dendrimers are probably not accessible to the albumin hydrophobic residues, and the weak polar interactions between the albumin hydrophilic residues and the dendrimer surface would not allow any significant structural alteration of the dendrimer and albumin. Moreover, it has been published that the binding of the dendrimers with proteins mainly occurs when both electrostatic and hydrophobic interactions take place.¹⁶ Perhaps a similar behaviour is occurring in the case of the carbosilane dendrimer, showing a high charge surface along with a high degree of hydrophobicity inside. Finally, the electrostatic interaction between the ODN and the carbosilane dendrimers may prevent the interaction of the former with domain III of the albumin.

In this study, both types of ODNs showed similar results as mentioned. Although special attention was focused on detecting possible differences, no changes were observed as described. The presence of six guanines in the oligonucleotide against the PPT element could cause different behaviour compared with that of TAR, due to the possible formation of the G-tetrads. We believe that the PPT oligonucleotide is probably not forming a very stable quadruplex. All the guanines are at the 3'-end and are situated in a row, so in order to form a quadruplex, four strands are needed to bind each other to form an intermolecular quadruplex. This type of quadruplex has been described to be less stable than intramolecular quadruplexes.¹⁷ An oligonucleotide having the six guanines separated in two groups of 3 guanines by 1–3 nucleotides will form a very stable quadruplex and hence, a more stable bimolecular quadruplex may be formed.

Electrophoresis experiments were confirmed by spectrofluorimetric results. Since ODNs were labelled with fluorescein, it was possible to study changes in its rotational freedom in the presence of BSA or dendrimers and in the system dendriplex + BSA. Again the dendriplex 3-ODN has been elected as a representative example. The rest of the dendriplexes formed by dendrimers 1, 2 and 4 afforded analogous results and a more detailed physico-chemical study will be published separately.¹⁸ The increase of the fluorescence polarization of fluorescein in the presence of dendrimers (Fig. 6A) or in the presence of BSA (Fig. 6B) indicates that ODNs were located in a more rigid environment. This is an indirect proof that ODNs created complexes with both dendrimers and BSA. However, it is worth mentioning that upon addition of dendrimers, the enhancement of polarization was bigger than after adding BSA. This may mean that the dendrimer-ODN union is stronger than that of the protein-ODN. Moreover, the process of forming complexes occurred at lower concentrations in the case of dendrimers. Therefore, a lower number of molecules of dendrimers were needed to complex ODN, compared to BSA. When ODN and dendrimer 3 were preincubated for 15 minutes in a charge ratio (+) (–) 5 : 1 at different concentrations and then the complexes were added to the BSA sample of constant concentration, no changes in the polarization of fluorescein (Fig. 6C) were observed. The value of the polarization equalled the level of the plateau from Fig. 6A. It means that the dendrimer-ODN complexes were stable and, additionally, they were not disrupted by the protein presence. Thus, this fact constitutes further evidence of the protective role of

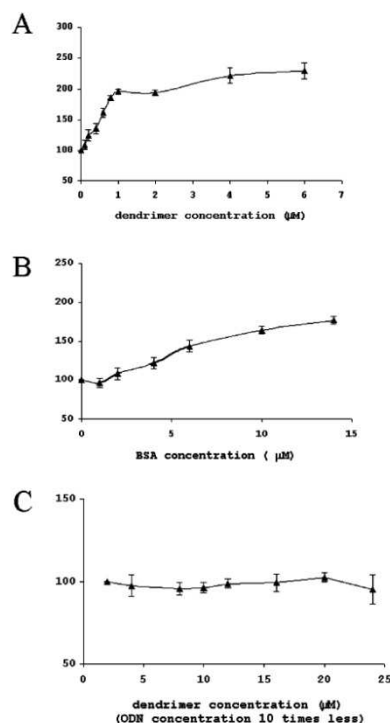


Fig. 6 (A) Changes in the polarization of labelled ODN (TAR) upon addition of dendrimer 3, $C_{\text{ODN}} = 0.1 \mu\text{M}$. (B) Changes in the polarization of labelled ODN (TAR) upon addition of BSA, $C_{\text{ODN}} = 0.1 \mu\text{M}$. (C) Changes in the polarization of labelled ODN (TAR) upon addition of complex 3-ODN (ratio (+) (–) 5 : 1) to BSA at a constant concentration of $10 \mu\text{M}$.

the carbosilane dendrimers for ODNs by preventing the formation of complexes between ODNs and serum albumin.

It is possible that weak electrostatic interactions between BSA and dendrimers can occur. In order to analyze them, BSA labelled with Alexa Fluor 488 (AF488) was used. We observed that dendrimer 3 quenched the fluorescence of AF488 that was attached to the surface of BSA (Fig. 7). Nevertheless, dendrimers were not able to change the intensity of intrinsic fluorescence of BSA (Fig. 7). It means that the environment of the two tryptophans remained unchanged. Quenching of AF488 fluorescence might occur *via* direct contact between the dendrimer and the fluorophore. However, no changes in the intrinsic fluorescence of BSA means that dendrimers did not cause any conformational disturbances within the protein molecule.

To confirm the protection effect described above, a preliminary biomedical study (toxicity, transfection and HIV inhibition assays)

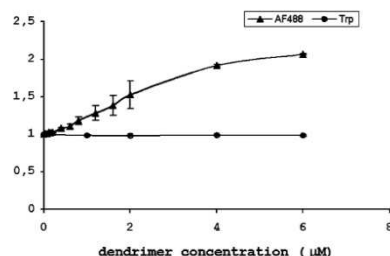


Fig. 7 Quenching of fluorescence of tryptophans ($C_{\text{BSA}} = 5 \mu\text{M}$) and AF488 ($C_{\text{BSA}} = 20 \mu\text{M}$) by dendrimer 3. F_0 —the initial fluorescence intensity, F —the fluorescence intensity after adding dendrimer 3.

of the use of dendriplexes in the presence of serum has been performed in order to evaluate its consequences. In this study, we have used dendrimers 3–4 and oligonucleotide sequences of different length (TAR, GEM91 and REV) as potential inhibitors of the HIV-1 virus (see Experimental section). The toxicity evaluation of dendrimers 3–4 has been carried out by means of MTT and LDH assays (see Fig. 8). For MTT, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) treated with 3 and 4 at $1 \mu\text{M}$ in the presence of 10% of fetal calf serum (FCS) at 18 and 36 h presented similar

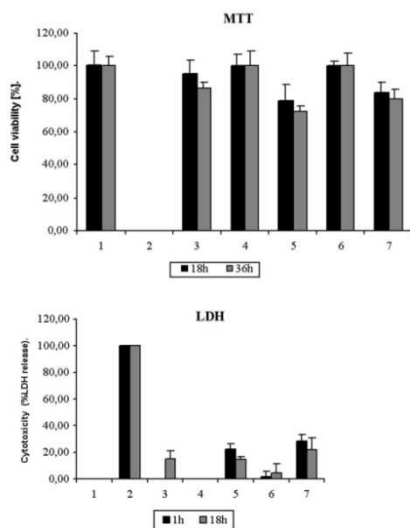


Fig. 8 (A) MTT assay at different times; (1) control; (2) DMSO 15%; (3) dextran $5 \mu\text{M}$; (4) dendrimer 3, $1 \mu\text{M}$; (5) dendrimer 3, $5 \mu\text{M}$; (6) dendrimer 4, $1 \mu\text{M}$; (7) dendrimer 4, $5 \mu\text{M}$. (B) LDH assay at different times; (1) control; (2) triton x-100, 0.5%; (3) dextran $5 \mu\text{M}$; (4) dendrimer 3, $1 \mu\text{M}$; (5) dendrimer 3, $5 \mu\text{M}$; (6) dendrimer 4, $1 \mu\text{M}$; (7) dendrimer 4, $5 \mu\text{M}$.

mitochondrial activities (MA) to the control. However, toxicities were increased around 20% when concentration was raised to $5 \mu\text{M}$. In another toxicity approach, cell membrane damage was measured by a lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay. Two different concentrations (1 and $5 \mu\text{M}$) were tested over 1 and 18 h exposure. At the lower concentration, dendrimers 3–4 did not induce significant LDH release (<5%). However, a 20% increase of membrane damage was observed at $5 \mu\text{M}$. To sum up, both assays indicate the lack of toxicity of the dendrimers in the presence of serum below $5 \mu\text{M}$ concentration.

Transfection of the dendriplex formed by 4 and fluoresceinated ODN (TAR) in PBMCs with a RPMI culture medium containing 10% of FCS was performed by confocal microscopy. Fig. 9 shows internalization and intracellular distribution of the ODN, illustrating that the dendriplex is not deactivated before the internalization process.

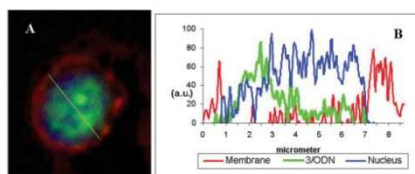


Fig. 9 (A) Confocal projection of six images of a representative T lymphocyte incubated with 3-ODN-FITC (TAR) dendriplex (green) for 24 h. The plasma membrane and the nucleus are stained with CD45 (red) and DAPI (blue), respectively. (B) Intensity profile along the depicted line in A (yellow). Note that most of 3-ODN is accumulated inside the nucleus.

Finally, HIV-1 inhibition assays using dendrimers 3–4 and the corresponding dendriplexes formed with single ODNs or cocktails (see Experimental section) were determined via ELISA through the evaluation of the p24 antigen release into culture supernatants of MT-2 and PBMCs (see Fig. 10). Dendrimers by themselves were not able to inhibit infection against HIV-1 (data not shown). With respect to the MT-2 cell, higher inhibitions were found when dendriplexes 4-ODN (TAR, 45%), 4-ODN (cocktail 1, 25%) and 4-ODN (cocktail 2, 53%) were used compared to ODNs alone (see Fig. 10A). All these dendriplexes did not cause significant LDH release (<10%) (see Fig. 10B) indicating that the dendrimer increases the inhibition efficiency without increasing toxicity in the presence of 10% of FCS. Analogous results have been observed in primary lines as PBMCs, more representative of physiological systems and at the same time less resistant to *in vitro* treatment. For instance, increased inhibition was found in the systems 3-ODN (TAR, 18%) or 4-ODN (cocktail 1, 43%) with respect to those observed for the ODN alone, both in the presence of serum (Fig. 10C and D respectively). All these features are consistent with a protective effect of the carboxylate dendrimers on the ODN action in the presence of serum. It is worth noting from Fig. 10C that inhibition was similar with the three sequences (antisense, sense, random), showing a diminution of around 1/3 in the p24 levels with respect to the control of infected non-treated cells. Thus, the inhibitory effects were due to non-sequence specific effects, as described previously.¹⁹ However, the results observed in

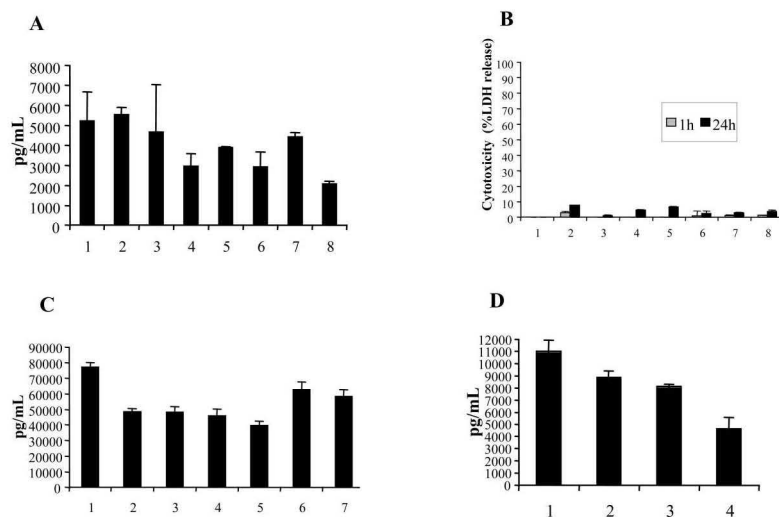


Fig. 10 (A) ELISA assay for p24 antigen release in MT-2 cells after 24 h incubation with dendriplexes. (B) The corresponding LDH cytotoxicity assay after 1 and 24 h. For A and B: (1) control; (2) dextran; (3) TAR; (4) 4-TAR; (5) cocktail 1; (6) 4-(cocktail 1); (7) cocktail 2; (8) 4-(cocktail 2). (C) and (D) ELISA assay for p24 antigen release in PBMCs after 24 h incubation with dendriplexes. (C) (1) Control; (2) TAR; (3) TARs; (4) random; (5) 3-TAR; (6) 3-TARs; (7) 3-random. (D) (1) Control; (2) dextran; (3) cocktail 1; (4) 4-(cocktail 1). Cocktails were an equimolecular mix of TAR + GEM91 (cocktail 1) or TAR + REV (cocktail 2) of final concentration 0.5 μ M.

the corresponding dendriplexes suggest some degree of specificity when the dendrimer is present.

Conclusion

In conclusion, when ODNs form complexes with the carbosilane dendrimers, the nucleic acid material is protected from binding to proteins. Such protection could provide a meaningful advance for therapies based on short nucleic acids. This could translate into a reduction in the dose of ODN necessary to achieve the biological effect. When a naked ODN is administered, it is necessary to saturate all the possible binding sites within serum proteins to have a fraction of free ODN able to reach the extravascular space and perform the desired activity. If these interactions could be prevented by the formation of a complex of ODNs with a carbosilane dendrimer, presumably the saturation of binding sites would no longer be necessary, resulting in the possibility of administering smaller amounts of ODN. In addition, this could reduce the toxic effects related to these unspecific unions of the ODN to serum proteins. The toxicity measurements of the dendrimers and the transfection of nucleic material using the corresponding dendriplexes cultured in the presence of serum show no alteration of such processes. The HIV inhibition assays, also in the presence of serum, show an increase of 25–50% on going from naked ODN to the corresponding dendriplex as evidence of the protective effect mentioned above. Therefore, the carbosilane dendrimers presented here are good candidates as carriers in

the context of biological applications of short nucleic acids and perhaps even other anionic drugs.

Experimental

Dendrimers and ODNs synthesis

Dendrimers **1–3** were prepared according to reported methods.¹⁵ Oligonucleotides were purchased from Eurogentec S.A. (Belgium). The ODNs sequences correspond to antisense (complementary) sequences of different HIV mRNAs: the HIV polypurine tract (PPT) element mRNA 5'-fluoresceine-TTT TCT TTT GGG GGG 3', 15 bases; TAR 5'-GCT CCC GGG CTC GAC C-3', 16 bases; GEM 91 5'-CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T-3', 25 bases; REV 5'-TCG TCG CTG TCT CCG CTT CTT CCT GCC A-3', 28 bases. TARs (sense) 5'-GGT CGA GCC CGG GAG C-3', 15 bases. Random 5'-GCC TCA CGC GCG CTC-3', 15 bases. Cocktails were a mix of TAR + GEM91 (cocktail 1) or TAR + REV (cocktail 2).

Synthesis of 2G-[Si{O(CH₂)₂N(Me)₂}(CH₂)₂NMe₃⁺(I⁻)₂]₆ (4**).** Over a diethyl ether (10 mL) solution of 2G-[Si{O(CH₂)₂N(Me)(CH₂)₂NMe₂}]₆¹⁵ (0.11 g, 0.04 mmol), a large excess of MeI (0.06 mL, 0.91 mmol) was added. The resulting solution was stirred for 48 h at room temperature and then evaporated under reduced pressure to remove residual MeI. The residue was washed with Et₂O (2 \times 5 mL) and dried under vacuum to give **4** as a white solid

(0.18 g, 86%). ^1H NMR (DMSO): δ = 4.00 (16H, t, OCH_2), 3.93 (32H, m, $\text{CH}_2\text{N}(\text{Me}_2)^+$), 3.59 (16H, t, $\text{CH}_2\text{N}(\text{Me}_2)^+$), 3.21 (120H, s br, $\text{N}(\text{Me}_2)^+$ and $\text{N}(\text{Me}_2)^+$), 1.35 (24H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$ and $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.72 (16H, m, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiO}$), 0.56 (32H, m, rest of the groups $-\text{CH}_2\text{Si}$), 0.13 (48H, s, OSiMe_2), -0.07 (12H, s, SiMe); ^{13}C NMR (DMSO): δ = 64.7 (OCH_2), 56.3, 56.0, 55.7 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{Me}_2)^+$ and $\text{CH}_2\text{N}(\text{Me}_2)^+$), 52.6 (NMe_2^+), 50.9 (NMe_2^+), 21.2–17.2 (groups $-\text{CH}_2-$ of the carbosilane skeleton), -2.5 (OSiMe_2), -5.5 (SiMe). Elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{128}\text{H}_{316}\text{N}_{16}\text{O}_4\text{Si}_{13}$: C, 33.40; H, 6.92; N, 4.87; found: C, 32.90; H, 6.75; N, 4.57.

Electrophoresis measurements

(i) *Formation of dendrimer-ODN complexes (dendriplexes)*: complex formation between dendrimers and ODNs was carried out using an electrostatic approach. Mixtures were achieved with an excess of positive charge to provide enough positive charges to be able to interact with the ODN. Consequently, dendrimers **1–4** were complexed with ODNs at an electrostatic charge ratio (+)–(–) of 2 : 1. Ratios of ODN to dendrimer were based on the calculation of the electrostatic charge present on each component, e.g. the number of S^- groups in the ODN vs. the number of terminal ammonium groups on the dendrimer. As an example, ODN and dendrimer **3** were diluted in sterile distilled water at 1 and 2 mg mL^{-1} respectively, 2.43 μL of ODN solution were mixed with 3.25 μL of **3** solution in RPMI medium at a final volume of 60 μL , with an incubation time of 20 minutes at room temperature. After this period of incubation, parts of the mixtures of dendrimer-ODN were further exposed to increasing concentrations of AB human serum in a final volume of 100 μL of RPMI medium (5%, 10%, 20%). (ii) *Evaluation of dendrimer-ODN complex formation and stability*: after incubation of dendrimer and ODN in the presence or absence of human AB serum, complex formation and stability were assessed by evaluation of migration retardation of fluoresceinated ODNs during electrophoresis of dendriplexes on 3% agarose gels. A 100 bp DNA ladder was used as reference (Gibco BRLTM). Fluorescein enhances the ODN signal markedly, facilitating the visualization of dendriplex migration during electrophoresis. Additionally, the gel was polymerized in the presence of ethidium bromide (EB) in order to make more evident the ODN migration. (iii) *Protein staining*: after electrophoresis was performed, a digital photo of the gel stained with EB was taken; the same gel was later stained to evidence the protein migration by treatment with Blue Paragon (Beckmann CoulterTM) protein staining. Finally, the gel was washed by immersion in a solution of 10% glacial acetic acid and a second digital photo was taken.

Spectrofluorimetric measurements

Fluorescent measurements were carried out with a Perkin-Elmer LS-50B spectrofluorometer. The excitation and emission wavelengths were 485 and 516 nm for ODNs labelled with fluorescein; 295 and 350 nm for BSA intrinsic fluorescence measurements; and 487 and 520 nm in the case of BSA labelled with Alexa Fluor 488 (AF488). The excitation and emission slit widths were set to 10 and 5 nm, respectively. Changes in the steady-state fluorescence polarization were monitored for fluorescein that was a label in

ODN. Additionally, the intensity of intrinsic fluorescence of BSA and the intensity of the probe AF488 that was covalently attached to BSA were measured.

Cells

PBMCs cells were derived from healthy voluntary donors, and obtained from leukophoresed blood by FicollTM gradient and elutriation centrifugation. Prior to investigation with dendrimers, PBMCs were stimulated for 48 h with phytohemagglutinin (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and interleukin 2 (IL-2, 100 IU mL^{-1}). On the day of the investigation, PBMCs were recovered and washed with phosphate buffered saline (PBS), and then seeded in RPMI 1640 (Gibco) medium supplemented with 10% of fetal calf serum, 1% L-glutamine, antibiotics, and 50 IU mL^{-1} of IL-2, in a 5% CO_2 environment and 95% r. h. (relative humidity) (100 000 cells per well in 96-well plates for the toxicity curve of dendrimer concentrations). The final volume in each well was 200 μL for the 96-well plates and 500 μL for the 24-well plates. MT-2 is a cell line transformed by human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and cells were seeded in the same conditions as PBMCs.

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay

This method was selected to analyze detrimental intracellular effects on mitochondria and metabolic activity. After 18 and 36 h of incubation of PBMCs with different concentrations of dendrimers in a 96-well plate, culture medium containing the dendrimers was replaced with 200 μL of serum-free Optimum. 20 μL of sterile filtered MTT (Sigma) stock solution in PBS pH 7.4 (5 mg mL^{-1}) were added to each well to achieve a final concentration of 0.5 mg MTT mL^{-1} . After 4 h, unreacted dye was removed by aspiration and the formazan crystals were dissolved in dimethyl sulfoxide (200 μL per well) (Sigma). The concentration of formazan was then determined spectrophotometrically in a plate reader (Biohit microplate reader 2001, Innogenetics[®]) at a wavelength of 550 nm (test) and 690 nm (reference). The spectrophotometer was calibrated to zero absorbance using Optimum medium without cells. The relative cell viability (%) related to control wells (cells with no dendrimer) was calculated by $[A]_{\text{test}}/[A]_{\text{control}} \times 100$. Each dendrimer concentration was tested in triplicate, according to ATCC directives.

Lactate dehydrogenase (LDH) assay

The LDH concentration in these samples was assayed utilizing a commercial kit (Cytotoxicity Detection Kit, Roche), allowing the spectrophotometric determination of the nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) reduction at 490 nm in the presence of lactate and LDH according to the manufacturer's protocol. After 1 and 24 h of incubation of cells with different concentrations of dendrimers in a 96-well plate, the supernatant was recovered. Controls were performed with 0.1% (w/v) Triton X-100 and set as 100% LDH release. The relative LDH release is defined by the ratio of LDH released over total LDH in the intact cells. Less than 10% LDH release was regarded as a non-toxic effect level in our experiments. All samples were run in triplicate.

Confocal microscopy

Cells for fluorescence microscopy were treated with 0.8% Trypan Blue (Sigma™) for 5 min and then again washed twice with PBS. TB positive cells exhibited membrane damage. In addition, TB is an extra-cellular fluorescence quenching agent. After TB staining, cells were seeded on glass slides coated with poly-L-lysine, fixed with 3% paraformaldehyde, and labelled with a primary anti-CD45 purified mouse anti-human monoclonal antibody (Becton Dickinson™). Samples were washed twice with PBS and then incubated with a secondary antibody labelled in red (Texas Red dye-conjugated AffiniPure F (ab)₂ fragment goat anti-mouse IgG + IgM (H + L), Jackson ImmunoResearch™). Cells were washed again twice with PBS. Finally, cells were treated for nuclear staining with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vyssys™) for 10 min and washed three times with PBS. Samples were mounted and images captured by a Leica TCS SP2 confocal microscope using different lines of excitation: 405, 488 and 514 nm.

Enzyme immunoassay

The ODN concentration for complexes with carbosilane dendrimers was 0.5 μM (1.27 μg). The concentrations of the dendrimers were approximately 1 μM for ODN alone, and 2 μM when complexed with cocktails (final concentration in well). All complexes were formed in 50 μL of PBS, with an incubation time of 20 min at room temperature. Cells were infected at 0.05 multiplicity of infection (MOI) with HIV isolate NL4-3 for 2 h. Then, cells were washed twice and maintained in the same culture medium as above, supplemented with IL-2 (50 U mL^{-1}) (300 000 cells per well in 24-well plates). The final volume for each well was 500 μL . ODN alone and complexed with dendrimer were added to the wells. The supernatant was collected at 24 h to evaluate antigen p24 by INNOTEST™ HIV antigen mAb (Innogenetics®). Dextran sulfate was purchased from Sigma (USA) and it was used as a macromolecule control (polycation).

Acknowledgements

We thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología (project CTQ2005-00795/BQU), the Plan Nacional de Salud (grant SAF-2004-06778, SAF-2003-09209), Red temática de Investigación Cooperativa Sanitaria ISCIII (RED RIS RD06/0006), Fundación Caja Navarra, FIPSE (36514/05), the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (grant BQU2004-02048), and Fundació LA CAIXA (BM04-52-0) for financial support. J. F. B.-M. is supported by a grant of Fondos de Investigación Sanitaria (CD05/00153). Dr Dmitry Shcharbin is a beneficiary of a Marie Curie International Incoming Fellowship within the 6th EU Framework Programme (grant 510018). We also want to thank R. Samaniego for help with confocal microscope image analysis and to N. Weber for corrections with the English in the paper.

References

- 1 L. Belmonte, P. Bare, M. M. De Bracco and B. H. Ruibal-Ares, *Curr. Med. Chem.*, 2003, **10**, 303–312.
- 2 S. Hacein-Bey-Abina, C. von Kalle, M. Schmidt, F. Le Deist, N. Wulffraat, E. McIntyre, I. Radford, J. L. Villeval, C. C. Fraser, M. Cavazzana-Calvo and A. Fischer, *N. Engl. J. Med.*, 2003, **348**, 255–256.
- 3 (a) S. K. Srinivasan, H. K. Tewary and P. L. Iversen, *Antisense Res. Dev.*, 1995, **5**, 131–139; (b) S. P. Henry, W. Novotny, J. Leeds, C. Auletta and D. J. Kornbrust, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 1997, **7**, 503–510; (c) E. Rayburn, W. Wang, R. Zhang and H. Wang, *Prog. Drug Res.*, 2005, **63**, 227–274.
- 4 (a) D. A. Geselowitz and L. M. Neckers, *Antisense Res. Dev.*, 1995, **5**, 213–217; (b) M. H. Fabani, J. I. Turner and M. J. Gait, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2006, **8**, 108–114.
- 5 (a) P. Hawley and I. Gibson, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 1996, **6**, 185–195; (b) Y. Nakta, T. K. Kim, S. Shtezline and A. M. Gewitz, *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression*, 2005, **15**, 163–182.
- 6 S. Zhang, Y. Xu, B. Wang, W. Qiao, D. Liu and Z. Li, *J. Controlled Release*, 2004, **100**, 165–180.
- 7 (a) S. M. Grayson and J. M. J. Fréchet, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 3819–3867; (b) S. E. Striiba, H. Frey and R. Haag, *Angew. Chem.*, 2002, **114**, 1385–1390, (*Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 1329–1334); (c) U. Boas and P. M. H. Heegaard, *Chem. Soc. Rev.*, 2004, **33**, 43–63.
- 8 (a) T. Hernández-Caselles, J. Villalain and J. C. Gómez-Fernández, *Mol. Cell. Biochem.*, 1993, **120**, 119–126; (b) J. P. Yang and L. Huang, *Gene Ther.*, 1997, **4**, 950–960; (c) C. Tros de Ilarduya and N. Düzgünes, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1463**, 333–342.
- 9 G. McLachlan, B. J. Stevenson, D. J. Davidson and D. J. Porteous, *Gene Ther.*, 2000, **7**, 384–392.
- 10 H. Yoo, P. Sazani and R. L. Juliano, *Pharm. Res.*, 1999, **16**, 1799–1804.
- 11 (a) M. Maszewska, J. Leclaire, M. Cieslak, B. Nawrot, A. Okruszek, A. M. Caminade and J.-P. Majoral, *Oligonucleotide*, 2003, **13**, 193–205; (b) C. Loup, M. A. Zanta, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral and B. Meunier, *Chem.–Eur. J.*, 1999, **5**, 3644–3650; (c) A. V. Maksimenko, V. Mandrouguine, M. B. Gottikh, J. R. Bertrand, J.-P. Majoral and C. Malvy, *J. Gene Med.*, 2003, **5**, 61–71.
- 12 D. Joester, M. Losson, R. Pugin, H. Heinzelmann, E. Walter, H. P. Merkle and F. Diederich, *Angew. Chem.*, 2003, **115**, 1524–1528, (*Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 1486–1490).
- 13 For some examples see: (a) B. Klajnert and M. Bryszewska, *Bioelectrochemistry*, 2002, **55**, 33–55; (b) B. Klajnert, L. Stanislawski, M. Bryszewska and B. Palecz, *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, **1648**, 115–126; (c) T. Chiba, T. Yoshimura and K. Esumi, *Colloids Surf., A*, 2003, **214**, 157–165.
- 14 J. Roesnecker, S. Naundorf, S. W. Gersting, R. W. Hauck, A. Gessner, P. Nicklaus, R. H. Muller and C. Rudolph, *J. Gene Med.*, 2003, **5**, 49–60.
- 15 (a) P. Ortega, J. F. Bermejo, L. Chonco, E. de Jesús, F. J. de la Mata, G. Fernández, J. C. Flores, R. Gómez, M. J. Serramia and M. A. Muñoz-Fernández, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, **7**, 1388–1396; (b) J. F. Bermejo, P. Ortega, L. Chonco, R. Eritja, R. Samaniego, M. Müller, E. de Jesús, F. J. de la Mata, J. C. Flores, R. Gómez and M. A. Muñoz-Fernández, *Chem.–Eur. J.*, 2007, **13**, 483–495.
- 16 M. F. Ottaviani, S. Jockusch, N. J. Turro, D. A. Tomalia and A. Barbon, *Langmuir*, 2004, **20**, 10238–10245.
- 17 V. Dapic, V. Abdomerovic, R. Marrington, J. Peberdy, A. Rodger, J. O. Trent and P. J. Bates, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 2097–2107.
- 18 D. Shcharbin, E. Pedziwiatr, L. Chonco, J. F. Bermejo-Martin, P. Ortega, F. J. de la Mata, R. Eritja, R. Gómez, B. Klajnert, M. Bryszewska and M. A. Muñoz-Fernandez, *Biomacromolecules*, submitted.
- 19 (a) C. Lavigne, J. Yelle, G. Sauvé and A. R. Thierry, *AAPS PharmSci*, 2002, **4**(2), article 9 (<http://www.aapspharmsci.org>); (b) J. F. Bermejo, L. Chonco, R. Samaniego, G. Fernández, R. Eritja and M. A. Muñoz-Fernández, *Eur. J. Sci. Res.*, 2006, **15**, 113–121.

Articles

Analysis of Interaction between Dendriplexes and Bovine Serum Albumin

Dzmitry Shcharbin,^{*,†} Elzbieta Pedziwiatr,[†] Louis Chonco,[‡] Jesus F. Bermejo-Martin,[‡] Paula Ortega,[§] F. Javier de la Mata,[§] Ramon Eritja,^{||} Rafael Gómez,[§] Barbara Klajnert,[†] Maria Bryszewska,[†] and M^a Angeles Muñoz-Fernandez[‡]

Department of General Biophysics, University of Lodz, Lodz, Poland, Laboratorio de Inmunobiología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá, Campus Universitario, Alcalá de Henares, Spain, and Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Jordi Girona, Barcelona, Spain

Received March 26, 2007; Revised Manuscript Received May 11, 2007

Dendrimers are new nanotechnological carriers for gene delivery. Short oligodeoxynucleotides (ODNs) are a new class of antisense therapy drugs for cancer and infectious or metabolic diseases. The interactions between short oligodeoxynucleotides (GEM91, CTCTCGCACCCATCTCTCTCTCT; SREV, TCGTCGCTGTCTC-CGCTTCTTCTGCGCA; unlabeled or fluorescein-labeled), novel water-soluble carboxilane dendrimers, and bovine serum albumin were studied by fluorescence and gel electrophoresis. The molar ratios of the dendrimer/ODN dendriplexes ranged from 4 to 7. The efficiency of formation and stability of the dendriplexes depended on electrostatic interactions between the dendrimer and the ODNs. Dendriplex formation significantly decreased the interactions between ODNs and albumin. Thus, the formation of dendriplexes between carboxilane dendrimers and ODNs may improve ODN delivery.

Introduction

Short oligodeoxynucleotides (ODNs) are a new class of antisense therapy drugs for cancer and infectious or metabolic diseases.¹ However, because of their anionic charge, ODNs can interact with serum albumins (major transport proteins that bind many anionic and cationic ligands²). The bioavailability of ODNs is decreased by such interactions with serum proteins, necessitating higher doses to achieve the desired therapeutic effect. In some cases, nonspecific binding to proteins can induce toxic effects, especially for phosphorothioate ODN derivatives.³ It has been shown that ODNs bound to serum albumins (or other proteins) do not enter the extravascular space.^{3–5} To reduce the interactions of ODNs with serum proteins, drug carriers such as liposomes or dendrimers have been proposed.^{6–7} However, lipoplexes (liposome/ODN complexes) are of limited use because liposomes bind nonspecifically to anionic serum proteins.^{8–9} Dendrimers have proved to be an alternative to liposomes and other polymeric systems for drug delivery. Their major advantages are uniform structure, multiple sites of attachment and the versatility with which their skeletons and surfaces can be modified, allowing the dendrimer/drug interaction to be characterized precisely. Dendritic carriers based on

polyamidoamine¹⁰ and phosphorus-containing¹¹ dendrimers show transfecting activity even in the presence of serum, despite possible interactions with serum albumins.^{12–14}

Water-soluble carboxilane dendrimers containing ammonium or amine groups at their peripheries have recently been described by our group as biocompatible molecules with good potential as ODN carriers. We have studied the interactions of different carboxilane dendrimers with an ODN sequence corresponding to an antisense sequence of the HIV mRNA polypurine tract element (5-fluorescein-AAT TTT CTT TTC CCC CCT-3).^{15–16}

In the present work we describe the interactions of bovine serum albumin (BSA) with the dendriplexes formed between ODNs (GEM91, CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T; SREV, TCG TCG CTG TCT CCG CTT CTT CCT GCC A; unlabeled or fluorescein-labeled) and ammonium-terminated carboxilane dendrimers with two different types of peripheral units based on neutral $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$ or $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Me})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$ fragments.

Materials and Methods

BSA and ethidium bromide (EB) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). BSA labeled with Alexa Fluor 488 (BSA-AF) was obtained from Invitrogen (USA). Fluorescein, FluorePrime fluorescein phosphoramidite and Sephadex G-25 were purchased from Amersham Biosciences (USA). A 100 bp DNA ladder was purchased from Gibco BRLTM (USA). Blue Paragon was purchased from Beckmann-Coulter (USA). Buffer solutions were obtained from POCh (Poland) and Sigma-Aldrich (USA). For fluorescence measurements, 0.15 mol/L Na-phosphate buffer (pH 7.4) was used.

1. Dendrimers and ODNs Synthesis. The dendrimers 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)]₈ (1) and 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)]₈ (2), containing

* Corresponding author. Address: Department of General Biophysics, University of Lodz, 12/16 Banacha St. 90-237 Lodz, Poland. E-mail: shcharbi@biol.uni.lodz.pl. Tel: + 48 42 635 44 74. Fax: + 48 42 635 44 74.

[†] University of Lodz.

[‡] Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

[§] Universidad de Alcalá.

^{||} CSIC.

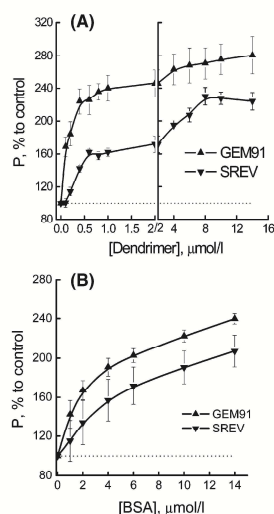


Figure 1. (A) Changes in GEM91 and SREV fluorescence polarization on addition of four carboxilane dendrimers. Data are presented on two X axis scales: 0–2 and 2–14 $\mu\text{mol/L}$. The dotted line indicates 100% polarization and corresponds to the fluorescence polarization of ODNs in the absence of dendrimers. (B) Changes in GEM91 and SREV fluorescence polarization on addition of different concentrations of BSA. The dotted line indicates 100% polarization and corresponds to the fluorescence polarization of ODNs in the absence of BSA. (A, B) [ODN] = 0.1 $\mu\text{mol/L}$, λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 516 nm, 37 °C; 0.15 mol/L Na–phosphate buffer, pH 7.4.

8 and 16 peripheral units, respectively, are of the same type, whereas 22G-[Si{O(CH₂)₂N(Me)(CH₂)₂NMe₃⁺}]₈ (3) and 2G-[Si{O(CH₂)₂N(Me)₂⁺}(CH₂)₂NMe₃⁺}]₈ (4), containing 8 groups of singly and doubly methylated outer fragments, respectively, have a different external architecture. Dendrimers 1–3 were prepared according to previously reported methods.^{15–16} Dendrimer 4 was prepared by a similar method, adding 16 equiv of MeI to the amine-terminated dendrimer 2G-[Si{O(CH₂)₂N(Me)(CH₂)₂NMe₃⁺}]₈.^{15–16} ODN sequences were prepared using standard solid-phase 2-cyanoethyl phosphoramidites¹⁷ in a 392 DNA synthesizer (Applied Biosystems, USA). Phosphorothioate linkages were introduced by replacing the iodine solution with a solution of 3H-1,2-benzodithiol-3-one-1,1-dioxide.¹⁸ Fluorescein was added to the 5'-end using FluorePrime fluorescein phosphoramidite. After the sequence was assembled, the ODN was stained in 32% aqueous ammonia at 55 °C for 16 h. The ammonia solution was evaporated to dryness and the product was desalted on a NAP-10 column (Sephadex G 25) and eluted with water. The length and homogeneity of the ODNs were confirmed by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Finally, the following ODNs were used: GEM91 (25 bases; FW 8112.5 g/mol; sequence CTC TCG CAC CCA TCT CTC TCC TTC T; labeled with fluorescein and non-labeled) and SREV (28 bases; FW 9086 g/mol; sequence: TCG TCG CTG TCT CCG CTT CTT CCT GCC A; unlabeled or fluorescein-labeled).

2. Fluorescence Measurements. Fluorescence was measured with a Perkin-Elmer LS-50B spectrofluorometer. The excitation and emission wavelengths were 485 and 516 nm for ODNs labeled with fluorescein; 295 and 350 nm for intrinsic BSA fluorescence; and 487 and 520 nm for BSA AF. All measurements were made at 37 °C. The excitation and emission slit widths were set to 10 and 5 nm, respectively.

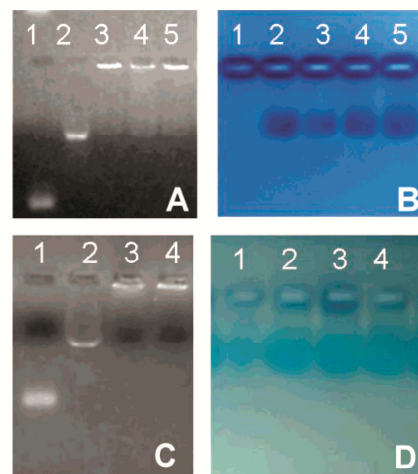


Figure 2. (A) Electrophoresis on a 3% agarose gel (stained with ethidium bromide) of dendriplexes formed by different carboxilane dendrimers and GEM91 in a 2:1 (+):(-) ratio in the presence of BSA. (B) The same gel stained with Blue Paragon showing protein migration. (1) GEM91; (2) GEM91 + 10% BSA; (3) 1/GEM91 + 10% BSA; (4) 3/GEM91 + 10% BSA; (5) 2/GEM91 + 10% BSA; (6) 4/GEM91 + 10% BSA. (C) Electrophoresis on a 3% agarose gel (stained with ethidium bromide) of dendriplexes formed by different carboxilane dendrimers and SREV in a 2:1 (+):(-) ratio in the presence of BSA. (D) The same gel stained with blue paragon showing protein migration. (1) SREV; (2) SREV + 10% BSA; (3) 3/SREV + 10% BSA; (4) 2/SREV + 10% BSA; (5) 4/SREV + 10% BSA.

The fluorescence polarization (P_{ABS}) of BSA, BSA-AF, and ODNs labeled with fluorescein was calculated as $P_{\text{ABS}} = (I_{\text{VV}} - G \times I_{\text{VH}}) / (I_{\text{VV}} + G \times I_{\text{VH}})$, where I_{VV} is the vertical component, I_{VH} the horizontal component of the light emitted by a fluorophore excited by vertical plane-polarized light, and G the G -factor. The G -factor was calculated as $G = I_{\text{HV}}/I_{\text{HH}}$, where I_{HV} is the vertical component and I_{HH} the horizontal component of the light emitted by a fluorophore excited by horizontal plane-polarized light. The relative polarization (P , as percentage of control) was calculated as $P = P_{\text{ABS}}/P_{\text{ABS}}^0 \times 100\%$, where P_{ABS} and P_{ABS}^0 are, respectively, the fluorescence polarization of BSA (or BSA-AF or fluorescein-labeled ODN) in the presence and absence of dendrimer.

Fluorescence quenching of BSA and BSA-AF was analyzed on the basis of the Stern–Volmer equation: $F_0/F - 1 = K_{\text{SV}}[Q]$, where F_0 is the intensity of fluorescence in the absence and F in the presence of the quencher, $[Q]$ is the quencher concentration, and K_{SV} is the quenching constant.

3. Gel Electrophoresis. The solutions were prepared with a sufficient excess of positive charge to be able to interact with the ODN; dendrimers 1–3 were added to the ODN solutions at an electrostatic charge ratio (+):(-) of 2:1. The ratio of ODN to dendrimer was based on the calculated electrostatic charge of each component, e.g., the number of S groups in the ODN versus the number of terminal ammonium groups on the dendrimer. As an example, ODN and dendrimer 1 were diluted in sterile distilled water at 1 and 2 mg/mL, respectively; 2.43 μL of ODN solution was mixed with 3.25 μL dendrimer 1 solution in PBS (final volume 60 μL) and incubated for 20 min at room temperature. After this incubation, some of the ODN–dendrimer mixture was exposed to increasing BSA concentrations in a

Table 1. (A) Number of Dendrimers Per Molecule of ODN, (B) Changes of Fluorescence Polarization (*P*, Percentage of Control) of Labeled ODNs on Addition of Dendrimers at Dendrimer/ODN Molar Ratios Taken from Part A, and (C) Quenching Constants of BSA and BSA-AF Fluorescence on Addition of Dendrimers^a

dendrimer	A		B		C	
	GEM91	SREV	n/SREV	n/GEM91	BSA	BSA-AF
1	0	0			0	0
2	3	6	129.1 ± 4	169.3 ± 10.9	0	0
3	4	7	159.6 ± 6.8	183.1 ± 14.3	0	0.07
4	4	7	142.3 ± 4.3	223.7 ± 15.4	0.0192	0.0017

^a *P* = 100% corresponds to fluorescence polarization of ODNs in the absence of dendrimers. B: λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 516 nm. C: [BSA] = 5 μ mol/L, λ_{ex} = 290 nm, λ_{em} = 350 nm. [BSA-AF] = 0.1 μ mol/L, λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 516 nm. A–C: 37 °C; 0.15 mol/L Na⁺-phosphate buffer, pH 7.4.

Table 2. (A) Changes of Fluorescence Polarization (*P*, Percentage of Control) of Dendriplexes (n/ODN) on Addition to BSA Solution at a BSA/dendrimer/ODN Molar Ratio 10/7/1 and (B) Changes of Fluorescence Polarization (*P*, Percentage of Control) of BSA/ODN Complex on Addition of Dendrimers at a Dendrimer/BSA/ODN Molar Ratio 7/10/1^a

dendrimer	A		B	
	n/GEM91 + BSA	n/SREV + BSA	n + BSA/GEM91	n + BSA/SREV
1	75 ± 6	72 ± 12	107 ± 6	106 ± 8
2	51.3 ± 2	75 ± 6	165 ± 12	123 ± 6
3	100 ± 3	100 ± 5	153 ± 11	135 ± 6
4	104 ± 8	97 ± 4	177 ± 3	112 ± 5

^a (A) *P* = 100% corresponds to fluorescence polarization of dendrimer/ODN dendriplex in absence of BSA. (B) *P* = 100% corresponds to fluorescence polarization of BSA/ODN complex in absence of dendrimers. A, B: [ODN] = 0.1 μ mol/L, λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 516 nm. 37 °C; 0.15 mol/L Na⁺-phosphate buffer, pH 7.4.

final volume of 100 μ L PBS. Complex formation and stability were assessed by the retardation of fluorescein-labeled ODN migration during electrophoresis on 3% agarose gels. A 100 bp DNA ladder was used as reference. Fluorescein enhanced the ODN signal significantly, facilitating visualization of the dendriplex during electrophoresis. In addition, the gel was polymerized in the presence of EB so that ODN migration was more evident. After electrophoresis, the EB-stained gel was digitally photographed; the same gel was subsequently stained with Blue Paragon to show protein migration. Finally, the gel was washed with 10% glacial acetic acid and a second digital photograph was taken.

Results and Discussion

1. Interaction between ODNs and Dendrimers. The interaction between ODNs and dendrimers was estimated by monitoring changes in the fluorescence polarization of fluorescein attached to the ends of the ODNs when increasing concentrations of dendrimers were added (Figure 1A, Table 1). These interactions depended on both the type of ODN and the type of dendrimer. Two binding processes were observed: first, specific binding between the dendrimer and the ODN (strong direct binding of dendrimer to ODN regions) when the dendrimer:ODN molar ratio was (2–7):1; second, micellation (weak binding/aggregation) of dendrimer/ODN complexes by dendrimer molecules when the dendrimer:ODN molar ratio was (10–40):1. This was confirmed by studies on the interaction between carboxylate dendrimers and the hydrophobic anionic fluorescent probe ANS (ref 19 and unpublished data). The micellation was characteristic for dendrimer **1**, while **2–4** showed specific binding. Dendrimers **3** and **4** bound ODNs more effectively, perhaps because of differences in the end groups.^{15–16} Both types of dendrimer, **1–2** and **3–4**, have positively charged NMe₃⁺ groups, but dendrimer **3** also has neutral –NR₂ groups capable of quaternization, forming cationic –NR₃⁺ groups as in **4**. The presence of two positive charges in **4** or two possible positive charges in **3** close to the surface increases the efficiency of binding. GEM91 binds effectively to practically all dendrimers, while SREV interacts with lower efficiency. These differ-

ences can be explained as follows. First, the ODNs differ in self-complementarity (docking), i.e., the maximal number of C–G and A–T pairs that may form in solution between two molecules of the same type of ODN. GEM91 has 3 pairs (2 pairs C–G + 1 pair A–T) and SREV has 6 pairs of C–G. Therefore, there are more possible ODN–ODN hydrogen bonding interactions for SREV than for GEM91.²⁰

2. Interactions between Dendrimers and BSA. The changes in ODN fluorescence polarization when different concentrations of BSA were added are shown in Figure 1B. BSA has a negative net charge of –17, but it consists of three domains each carrying different net charges at physiological pH: –11 (domain I), –7 (domain II), and +1 (domain III).² Anionic ODNs can bind to the surface of domain III. Table 1B,C shows the differences in BSA fluorescence quenching when different concentrations of dendrimers were added. Monitoring changes in the intrinsic fluorescence of BSA allows even subtle alterations in BSA structure to be followed.^{12–14} The dendrimers affected neither the quenching of fluorescence from the internal and external tryptophanyls of BSA nor the fluorescence polarization (data not shown). Therefore, the dendrimers did not significantly affect the conformation of the protein over the concentration range studied. In contrast, the dendrimers quenched the fluorescence of AF, the label attached to the BSA surface. This indicates that the interactions between carboxylate dendrimers and BSA were weak and occurred preferentially at the protein surface.

3. Dendriplex (Dendrimer/ODN Complex) and BSA. Next, dendriplexes were formed by adding dendrimers to ODN solutions at a 7:1 molar ratio and incubating the mixture for 15 min. Aliquots of the dendrimer/ODN dendriplex solution were added to the BSA solution and changes in ODN fluorescence polarization were monitored. The results are shown in Table 2. In the presence of BSA, the fluorescence polarization of the 1/ODN and 2/ODN complexes decreased from 100% to 75%, while that of the 3/ODN and 4/ODN complexes did not change significantly. This indicates that BSA destroyed the 1/ODN or 2/ODN micelles by interacting more strongly with either the ODN or the dendrimer. In contrast, BSA did not affect the dendriplexes formed by **3** or **4** with ODNs.

4. Addition of Dendrimers to ODN + BSA Complexes.

The interaction between BSA and dendriplexes was also studied by adding BSA to ODN solutions at a 7:1 molar ratio, incubating for 15 min, then adding increasing concentrations of dendrimer and monitoring the changes in ODN fluorescence polarization. The results are shown in Table 2A. Addition of the dendrimer increased the fluorescence polarization of the ODN. This effect was similar to that of the dendrimers in the absence of BSA (see Figure 1A). It is likely that the dendrimer competed with BSA for the ODN; the dendrimer destroyed the BSA/ODN complex and formed dendriplexes with the ODN.

5. Gel Electrophoresis. The fluorescence experiments were confirmed by electrophoresis. Figure 2 illustrates the interactions between dendrimers and ODNs and between BSA and the dendriplexes: dendrimer/GEM91 (A, B) and dendrimer/SREV (C, D). The electrophoretogram shows that the migration patterns differ depending on the agent used. ODN migration was retarded in the presence of BSA, indirectly indicating the formation of an ODN-protein complex. It was also altered in the presence of the dendrimers because a dendrimer-ODN complex formed, as described above. It is worth noting that addition of BSA to the dendriplexes did not change the migration pattern; under these conditions, BSA was unable to dissociate the complex.

Conclusions

Carbosilane dendrimers 2–4 can bind GEM91 and SREV effectively. The most effective were carbosilane dendrimers containing two N-donor atoms in the outer units. The molar ratios of the dendrimer/ODN dendriplexes ranged from 4 to 7. Dendriplex stability depended on electrostatic interactions between the dendrimer and the ODN. Dendriplex formation protected the ODN from binding to BSA. Thus, carbosilane dendrimers, mainly those containing two N-donor atoms in the outer units, are good candidates as carriers for delivery of ODNs and other anionic drugs.

Acknowledgment. We thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Grant CTQ2005-00795/BQU), the Plan Nacional de Salud (Grants SAF-2004-06778 and SAF-2003-09209), the Red Temática Cooperativa de investigación en sida y genética (Grants RIS G03/173 and PI061479) of Fondos de Investigación Sanitaria (FIS), FIPSE (Grant 36514/05), the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Grant BQU2004-02048), and Fundació LA CAIXA (grant BM04-52-0) for financial

support. J.F.B. is supported by a grant from Fondos de Investigación Sanitaria (grant CM04/00136) Madrid. D.S. was a beneficiary of a Marie Curie International Incoming Fellowship within the 6 EU Framework Programme (Grant 510018) and the Kasa Mianowski Fund.

References and Notes

- (1) Juliano, R.; Alahari, S.; Yoo, H.; Kole, R.; Cho, M. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 494–502.
- (2) Peters, T., Jr. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*; Academic Press: San Diego, 1996.
- (3) Srinivasan, S.; Tewary, H.; Iversen, P. *Antisense Res. Dev.* **1995**, *5*, 131–139.
- (4) Henry, S.; Novotny, W.; Leeds, J.; Auletta, C.; Kombrust, D. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 503–510.
- (5) Geselowitz, D.; Neckers, L. *Antisense Res. Dev.* **1995**, *5*, 213–217.
- (6) Hawley, P.; Gibson, I. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1996**, *6*, 185–195.
- (7) Zhang, S.; Xu, Y.; Wang, B.; Qiao, W.; Liu, D.; Li, Z. *J. Control. Release* **2004**, *100*, 165–180.
- (8) Hernández-Caselles, T.; Villalón, J.; Gómez-Fernández, J. *Mol. Cell. Biochem.* **1993**, *120*, 119–126.
- (9) Yang, J.; Huang, L. *Gene Ther.* **1997**, *4*, 950–960.
- (10) Yoo, H.; Sazani, P.; Juliano, R. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1799–1804.
- (11) Maszewska, M.; Leclaire, J.; Cieslak, M.; Nawrot, B.; Okruszek, A.; Caminade, A.; Majoral, J.-P. *Oligonucleotide* **2003**, *13*, 193–205.
- (12) Klajnert, B.; Bryszewska, M. *Bioelectrochemistry* **2002**, *55*, 33–55.
- (13) Klajnert, B.; Stanisławska, L.; Bryszewska, M.; Palecz, B. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1648*, 115–126.
- (14) Shcharbin, D.; Klajnert, B.; Bryszewska, M. *J. Biomater. Sci. Polym. Educ.* **2005**, *16*, 1081–1093.
- (15) Ortega, P.; Bermejo, J.-F.; Chonco, L.; de Jesús, E.; de la Mata, F.-J.; Fernández, G.; Flores, J. C.; Gómez, R.; Serramía, M. J.; Muñoz-Fernández, M. A. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *7*, 1388–1396.
- (16) Bermejo, J. F.; Ortega, P.; Chonco, L.; Ertija, R.; Samaniego, R.; Müllner, M.; de Jesús, E.; de la Mata, F. J.; Flores, J. C.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, M. A. *Chemistry* **2007**, *13*, 483–495.
- (17) Sinha, N.; Biernat, J.; McManus, J.; Koster, H. *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 4539–4557.
- (18) Iyer, R.; Phillips, L.; Egan, W.; Regan, J.; Beauchage, S. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4693–4699.
- (19) Chonco, L.; Shcharbin, D.; Pedziwiatr, E.; Klajnert, B.; Ortega, P.; Muñoz-Fernández, M. A.; Bryszewska, M. Binding Capacity of Water-Soluble Carbosilane Dendrimers. In *Late Abstract Book of 31 FEBS Congress*; Istanbul, Turkey, 2006; p 50; Kopinski, M.; Roberts, T., Eds.; Blackwell Publishing Ltd.: Oxford, U.K.
- (20) Catalanotti, B.; Galeone, A.; Gomez-Paloma, L.; Mayola, L.; Pepe, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2005–2009.

BM070333P

Binding Properties of Water-Soluble Carbosilane Dendrimers

Elzbieta Pedziwiatr · Dzmityr Shcharbin ·
Louis Chonco · Paula Ortega · F. Javier de la Mata ·
Rafael Gómez · Barbara Klajnert · Maria Bryszewska ·
Ma Angeles Muñoz-Fernandez

Received: 29 May 2008 / Accepted: 11 August 2008 / Published online: 30 August 2008
© Springer Science + Business Media, LLC 2008

Abstract Dendrimers have been proposed as new carriers for drug delivery. They have distinctive characteristics, such as uniform and controlled size, monodispersity and modifiable surface group functionality, which make them extremely useful for biomedical applications. In this study, the binding capacity of water-soluble carbosilane dendrimers was examined. A double fluorimetric titration method with 1-anilinonaphthalene-8-sulphonic acid (ANS) was used to estimate the binding constant and the number of binding centers per dendrimer molecule. The data obtained suggest that ANS interacts non-covalently with the dendrimers. Second generation dendrimers have an open, asymmetric structure that allows them to encapsulate ANS. The ability of the polymers to interact with DNA was assessed by an ethidium bromide (EB) displacement assay. All the dendrimers studied bound to DNA in competition with EB, though the strength of binding varied. Dendrimer

interactions with a protein (BSA) were tested using fluorescence quenchers. The dendrimers caused no conformation change in the protein, indicating that interactions between carbosilane dendrimers and BSA are weak and occur preferentially at the protein surface.

Keywords Carbosilane dendrimer · Drug delivery · Fluorimetric titration · EB intercalation · Fluorescence quenching

Introduction

There is a continual search for novel therapeutic strategies to improve the treatments of different diseases. In recent decades, studies of polymer chemistry in relation to biomedical sciences have led to the birth of nano-sized (5–100 nm) polymer-based pharmaceuticals. This family of constructs, termed polymer therapeutics, nanospheres, nanocontainers or nanodevices, is very promising in biomedical applications such as drug delivery, gene transfection and imaging [1]. Constructs used as carriers for drug delivery should generally be in the nanometer range and uniform in size so that their ability to cross cell membranes is enhanced and the risk of undesired clearance from the body through the liver or spleen is reduced [2]. The synthesis of dendrimers offers the opportunity to generate monodisperse, structure-controlled macromolecular architectures similar to those observed in biological systems [3–5]. Dendrimers may be visualized as consisting of three critical architectural domains: (a) a multivalent surface, containing a large number of potentially reactive/passive sites (nano-scaffolding); (b) an interior shell surrounding the core; and (c) a core to which the dendrons are attached [2]. The conformation of a dendrimer depends on the

E. Pedziwiatr · D. Shcharbin · B. Klajnert · M. Bryszewska (✉)
Department of General Biophysics, University of Lodz,
12/16 Banacha St.,
90-237 Lodz, Poland
e-mail: marbrys@biol.uni.lodz.pl

L. Chonco · M. A. Muñoz-Fernandez
Laboratorio de Inmunobiología Molecular,
Hospital General Universitario Gregorio Marañón,
Madrid, Spain

P. Ortega · F. Javier de la Mata · R. Gómez
Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá,
Campus Universitario,
Alcalá de Henares, Spain

L. Chonco · P. Ortega · F. Javier de la Mata · R. Gómez ·
M. A. Muñoz-Fernandez
Networking Research Center on Bioengineering,
Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN),
Barcelona, Spain

solvent. Polar dendrimers have higher core densities in apolar solvents because the dendrimer arms are folded back into the interior, but have higher surface densities in polar solvents [6]. Less polar dendrimers (containing aryl groups or other hydrophobic units) show the opposite dependence of conformation on solvent and behave as inverse micelles [7].

There have been several thousand publications on the characterization of dendrimers, deploying a range of techniques including NMR, IR, Raman, UV-Visible and fluorescence spectrometry, circular dichroism, X-ray diffraction, mass spectrometry, SAXS, SANS, laser light scattering, microscopy, SEC, EPR, electrochemistry, electrophoresis, intrinsic viscosity, DSC and dielectric spectroscopy [8]. There are several different kinds of dendrimers, for example polyamidoamine (PAMAM), polypropyleneimine (PPI), polylysine (Ply), polybenzylether (PBzE), polyphenylene (PHEN), thiophosphoryl phenoxymethyl (methylhydrazono; PMMH). In recent years, much effort has been devoted to the preparation of dendrimers that are designed to be highly biocompatible and water-soluble. In addition, some dendrimers have been designed to be biodegradable, with monomer units that are intermediates or products of metabolic pathways [9]. Some dendrimers have different biofunctional moieties, for example folic acid [10] and polyethylene oxide chains (PEO) [11].

Comparison of the features of dendrimers with those of linear polymers shows that the dendritic architecture provides several advantages for drug delivery applications. For example, the controlled multivalency allows several drug molecules, targeting groups and solubilizing groups to be attached in a well-defined manner to the periphery of a dendrimer. In addition, the low polydispersity should provide more reproducible pharmacokinetic behavior than is obtained using linear polymers that contain fractions with vastly different molecular weights. Furthermore, the relatively globular shapes of dendrimers, as opposed to the random coil structure of most linear polymers, could affect their biological properties, leading to interesting effects related to macromolecular architecture [9].

Early studies of dendrimers as potential delivery systems focused on their use as unimolecular micelles and boxes for the noncovalent encapsulation of drug molecules [12–15].

An alternative approach to the development of dendrimers as drug carriers is to exploit their well-defined multivalency by attaching drug molecules covalently to the periphery. Drug loading can be tuned by varying the generation number of the dendrimer, and drug release can be controlled by incorporating degradable drug-dendrimer linkages. Yang and Lopina have conjugated penicillin V with G2.5 and G3 PAMAM [16] and the antidepressant venlafaxine with G2.5 PAMAM [17]. Several workers have developed dendrimer conjugates with potential application

as vehicles for delivering anticancer agents such as cisplatin [18], doxorubicin [19], methotrexate [20] and 5-fluorouracil [21].

The large numbers of ionizable groups on dendrimer surfaces present an interesting opportunity to attach numerous ionizable drugs electrostatically, enhancing water solubility. Also, the interiors of several dendrimer classes are available for complexing with ions [22]. Cationic dendrimers with primary amine end groups ($-NH_2$) on the surface and tertiary amine groups ($>N-$) at branching points in the core can interact with anionic groups of polymer chains, i.e. they can be fully penetrated by linear polyanions [23]. In contrast, linear polycations can only interact with carboxylated dendrimers via the dendrimer surface groups, possibly because the tertiary amine groups in the dendrimer core restrict penetration by the polycation [24]. Cationic dendrimers have been complexed with ibuprofen [25], piroxicam [26] and indomethacin [27], and also with DNA or oligonucleotides. Electrostatic interactions between dendrimers and anionic genetic material have been widely studied during recent years and open the possibility of using dendrimers for gene transfection.

The aim of this study was to characterize the binding properties of water-soluble carbosilane dendrimers as candidates for drug targeting. For this purpose we have checked the ability of carbosilane dendrimers to bind ANS and DNA and their interactions with bovine serum albumin.

Water-soluble carbosilane dendrimers containing peripheral ammonium or amine groups have recently been described by our groups as biocompatible molecules with potential as non-viral carriers (low toxicity profiles, no antigenicity) [28, 29]. We previously showed that such dendrimers form complexes (dendriplexes) with oligonucleotides. The efficiency of formation and the stability of the dendriplexes depend on electrostatic interactions with the oligonucleotides. Dendriplex formation significantly decreases the interactions between oligonucleotides and albumin [30, 31]. To screen the dendrimers, however, more simple tests are needed in order to determine their binding capacity and their ability to interact with proteins. A double fluorometric titration technique involving intercalation of the fluorescent probe ANS and ethidium bromide (EB) allows us to study the binding properties of carbosilane dendrimers. Interactions with proteins were tested using fluorescence quenchers. The accessibility of the protein-dendrimer complex to quenchers allows such interactions to be estimated.

Materials and methods

Calf thymus DNA (ctDNA), ethidium bromide (EB), 1-anilinonaphthalene-8-sulphonic acid (ANS), bovine serum albumin (BSA), acrylamide, cesium chloride and potassium

iodide were obtained from Sigma-Aldrich (USA). Other chemicals were of analytical grade. Double-distilled water was used to prepare all solutions; 0.15 mol/l Na-phosphate buffer (pH 7.4) was used.

All fluorescence measurements were taken with a Perkin-Elmer LS-50B spectrofluorimeter at 37°C.

Dendrimer synthesis

The dendrimers used in this study were cationic carbosilane dendrimers with peripheral ammonium groups. They were prepared according by reported methods [28, 29]. These dendrimers were 2G-[Si(OCH₂-CH₂NMe₃⁺I⁻)]₈ (1), 2G-[Si(OCH₂CH₂NMe₃⁺I⁻)₂]₈ (2), 2G-[Si{O(CH₂)₂N(Me)(CH₂)₂NMe₃⁺I⁻}]₈ (3) and 2G-[Si{O(CH₂)₂N(Me)₂⁺(CH₂)₂NMe₃⁺I⁻}]₈ (4). The abbreviation 2G means second generation. We have adopted the convention that each generation is formed on the basis of shell of silicon atoms. Then, starting from the core, this will be generation zero. The following four silicon atoms form the generation 1, and finally the eight terminal silicon atoms form the generation 2. This is independently of the number of terminal groups. We can have a second generation with

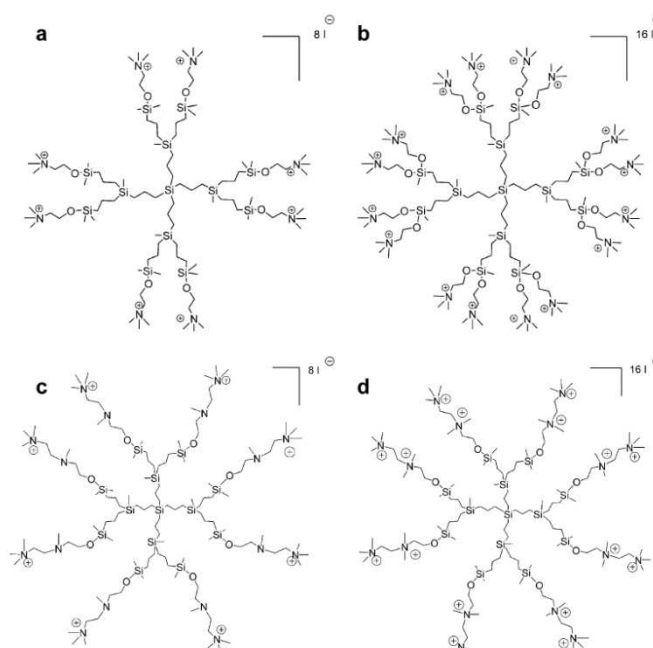
eight or 16 groups. They contain one nitrogen atom (N) per branch (dendrimers 1, 2, called N group dendrimers) or two nitrogens (NN) per branch (dendrimers 3, 4, called NN group dendrimers). See Fig. 1 for molecular structures.

Double fluorimetric titration assay by ANS

ANS was dissolved in phosphate buffer. The excitation and emission wavelengths were set at 370 nm and between 400 and 600 nm respectively. It was established that the dendrimers alone were not excited by 370 nm irradiation and did not emit fluorescence. The excitation and emission slit widths were 5 and 2.5 nm, respectively. During measurements the samples were continuously stirred in 1-cm path length quartz cuvettes.

The binding constant (K_b) and the number of binding sites per dendrimer molecule (n) were estimated using double fluorimetric titration [32]. In the first fluorimetric titration, increasing concentrations of dendrimer were added to ANS solution at constant concentration and the maximum intensity (F_{max}) of ANS fluorescence was recorded. This corresponded to the binding of all the ANS molecules by the dendrimer. The maximum fluorescence

Fig. 1 The molecular structure of the dendrimers



intensity of ANS divided by its concentration gave the specific fluorescence intensity for the bound probe (F_{sp}):

$$F_{sp} = \frac{F_{max}}{C_{ANS}^1}, \quad (1)$$

where (C_{ANS}^1) is the ANS concentration during the first fluorimetric titration.

In the second titration, the dendrimer concentration (C_D) was constant while the ANS concentration was increased (C_{ANS}^2). The fluorescence intensity (F) was then measured. The concentration of ANS bound by dendrimers was calculated using the equation:

$$C_{ANS}^{bound} = \frac{F}{F_{sp}}, \quad (2)$$

The concentration of free ANS molecules was determined as follows:

$$C_{ANS}^{free} = C_{ANS}^2 - C_{ANS}^{bound}. \quad (3)$$

The binding constants for the fluorescent probe molecules (K_b) and the number of ANS binding centers in the solution (N) could be calculated using the formula:

$$\frac{1}{C_{ANS}^{bound}} = \frac{1}{K_b \cdot N \cdot C_{ANS}^{free}} + \frac{1}{N}, \quad (4)$$

Equation 4 was modified by replacing the number of binding centers in solution (N) with the number of binding centers per dendrimer molecule (n), yielding the final equation:

$$\frac{C_D}{C_{ANS}^{bound}} = \frac{1}{K_b \cdot n \cdot C_{ANS}^{free}} + \frac{1}{n}, \quad (5)$$

where

$$n = \frac{N}{C_D} \quad (6)$$

and the constants were determined from the initial (linear) portions of a graph of $\frac{C_D}{C_{ANS}^{bound}}$ versus $\frac{1}{C_{ANS}^{free}}$ (Fig. 1c).

Ethidium bromide intercalation assay

Ethidium bromide and ctDNA were used at final concentrations of 1 $\mu\text{g/ml}$ and 3 $\mu\text{g/ml}$, respectively, in 0.15 mol/l Na-phosphate buffer, pH 7.4. The fluorescence spectra of pure EB and of EB in the presence of DNA were recorded before and after addition of dendrimers. An excitation wavelength of 477 nm was used. The emission spectra were recorded from 500 to 800 nm. Under these conditions the fluorescence intensity of pure EB at the emission maximum (618 nm) was ~100 relative units of the device. The fluorescence intensity of EB in the presence of DNA before and after the dendrimers were added was measured at 604 nm (the emission maximum). The excitation and emission slit widths were set to 14.0 and

8.0 nm, respectively. The samples were contained in 1 cm path length quartz cuvettes and were continuously stirred. Before the fluorescent properties of the DNA–EB–dendrimer complex were examined, it was established that the dendrimers do not interact with EB.

The data were used to calculate the apparent dendrimer–ctDNA binding (association) constants (K_{ass}^{DEN}) using two different equations. The first equation is

$$K_{ass}^{DEN} = K_{ass}^{EB} \cdot \frac{[EB]_0}{[D]_{50}} \quad (7)$$

where K_{ass}^{EB} is the association constant of EB with ctDNA, $[EB]_0$ is the total concentration of EB in solution and $[D]_{50}$ is the concentration that generates a 50% decrease in the initial fluorescence intensity of the EB–DNA complex [33]. The second equation is

$$\frac{1}{K_{ass}^I} = \frac{IC_{50}}{1 + L_T \cdot K_{ass}^L} \quad (8)$$

where K_{ass}^I is the inhibitor association constant ($=K_{ass}^{DEN}$), IC_{50} is the concentration of inhibitor (I =dendrimer) necessary to displace 50% of the labeled ligand, L_T is the total concentration of the labeled ligand (EB) and K_{ass}^L is the association constant for the labeled ligand ($=K_{ass}^{EB}$) [34, 35].

It follows from these equations that

$$[D]_{50} = IC_{50} \quad (9)$$

In 0.2 mol/l Na-phosphate buffer (pH 7.4), K_{ass}^{EB} was $(1.70 \pm 0.04) \times 10^5$ (mol/l)⁻¹ [36].

To calculate the constants, the data graphs were modified so that the changes in fluorescence intensity of the EB–ctDNA complex when dendrimers were added were presented as

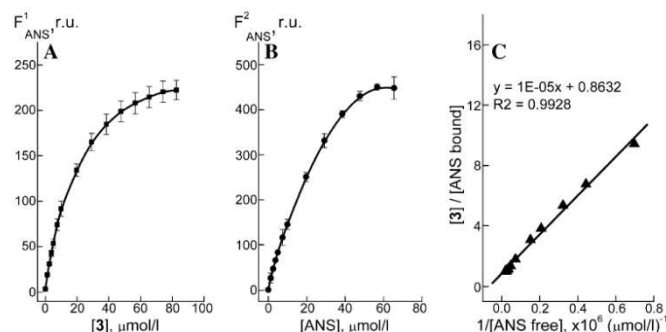
$$F^{rev} = \frac{F_{complex} - F_{pureEB}}{F_{complex} - F_{pureEB}} \quad (10)$$

where $F_{complex}$ is the fluorescence of EB–ctDNA in the absence and presence of dendrimer, F_{pureEB} is the fluorescence of pure (free) EB, and $F_{complex}$ is the fluorescence of the EB–ctDNA complex in the absence of dendrimer when EB is fully bound by the ctDNA.

Fluorescence quenching

BSA was dissolved in 0.15 mol/l Na-phosphate buffer (pH 7.4) at 5 $\mu\text{mol/l}$. A neutral fluorescence quencher, acrylamide, and two ionic quenchers, potassium iodide (quenching ion I⁻) and cesium chloride (quenching ion Cs⁺), were used for these studies. Increasing aliquots of the quencher were added to 5 $\mu\text{mol/l}$ BSA from a stock solution in water. The stock solutions of acrylamide, KI and CsCl were 1, 5 and 10 mol/l, respectively. The stock KI

Fig. 2 Double fluorimetric titration of ANS vs dendrimer 3: **a** The dependence of ANS fluorescence intensity on the concentration of dendrimer 3 at constant ANS concentration (5 $\mu\text{mol/l}$). **b** The dependence of ANS fluorescence intensity on ANS concentration at constant concentration of dendrimer 3 (10 $\mu\text{mol/l}$). **c** Scatchard–Klotz plot of $[3]/[\text{ANS bound}]$ vs $1/[\text{ANS free}]$. $\lambda_{\text{exc}}=370\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=480\text{ nm}$



solution contained 0.1 mmol/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ to prevent oxidation of Γ^- to I_3^- . The fluorescence intensity at the emission maximum (350 nm) was measured after excitation at 295 nm. The emission slit width was kept at 10 nm and the excitation slit width was 3.4 nm. Quenching data were collected for native BSA dissolved in buffer and for BSA supplemented with 0.1 mmol/l dendrimers.

The quenching results for acrylamide were analyzed by the Stern–Volmer equation:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad (11)$$

where F_0 and F are, respectively, fluorescence intensities in the absence and presence of quencher, K_{SV} is the Stern–Volmer dynamic quenching constant and $[Q]$ is the concentration of the quencher. The equation assumes a linear relationship between F_0/F and $[Q]$ with a slope of K_{SV} . The Stern–Volmer constants express the accessibility of the chromophore to the quencher [37].

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm S.E.M. of 6 independent experiments. Statistical calculations were done by Origin 7.0 (OriginLab Corp., USA). The Shapiro–Wilk test was used to ensure normal distributions. Statistical analysis of the results was done with Student–Fischer test. Also, the

statistical significance of curves was assessed using statistical Box plots including mean, 5% and 95% Wisker lines, 25 and 75 percentiles, and lower and upper confidence intervals (at $\alpha=0.05$).

Results and discussion

Double fluorimetric titration using ANS

An aqueous solution of pure ANS fluoresced weakly in the range 400–600 nm with a maximum at 520 nm; its fluorescence yield in a polar environment is low [38]. Figure 2 shows the results of double fluorimetric titration of ANS and dendrimer 3. Figure 2a, b show that the

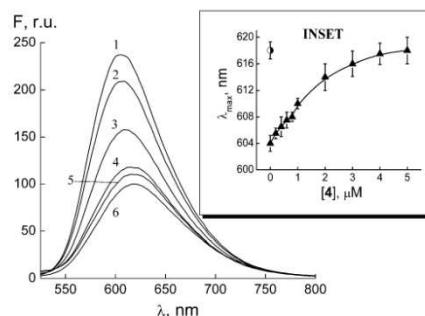
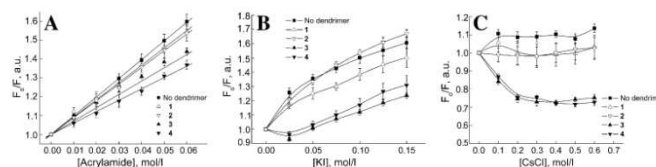


Fig. 3 Fluorescence emission spectra of pure EB (6), EB complexed with ctDNA (1) and EB-ctDNA complex in the presence of dendrimer 4 at 0.4 $\mu\text{mol/l}$ (2), 1 $\mu\text{mol/l}$ (3), 2 $\mu\text{mol/l}$ (4) and 5 $\mu\text{mol/l}$ (5). The spectra at 0.2, 0.6, 3 and 4 $\mu\text{mol/l}$ are not presented. Inset shows the dependence of the fluorescence emission maximum of the EB-ctDNA complex on the concentration of dendrimer 4 (triangles). The fluorescence emission maximum of pure EB is shown as a circle. $[\text{EB}]=1\text{ }\mu\text{g/ml}$, $[\text{DNA}]=3\text{ }\mu\text{g/ml}$, $\lambda_{\text{exc}}=477\text{ nm}$, 0.15 mol/l Na-phosphate buffer, pH 7.4, 37°C

Table 1 Binding constants, number of binding centers per molecule and blue shift of ANS fluorescence emission maximum for binding between ANS and water-soluble carboxylate dendrimers

	$K_b \times 10^{-5}$ (mol/l) $^{-1}$	N ($\mu\text{mol/l}$)	n	Dendrimer/ ANS	$\Delta\lambda$ (from 520 nm to ...)
1	0.7–2.0	1–3	0.1–0.3	~8:1	473 \pm 1.9 nm
2	0.6–2.1	3–4	0.3–0.4	~3:1	470 \pm 1.7 nm
3	1.0–1.5	8–10	0.8–1.2	~1:1	481 \pm 1.4 nm
4	1.0–1.4	7–13	0.7–1.3	~1:1	481 \pm 1.2 nm

Fig. 5 Curves of BSA fluorescence quenching by acrylamide (a), KI (b) and CsCl (c) in the absence and presence of carboxilane dendrimers. [BSA]=5 μ mol/l, [Dendrimer]=100 μ mol/l. λ_{exc} =295 nm, λ_{em} =350 nm



ctDNA was so weak that it was impossible to estimate its association constant using EB. In contrast, dendrimers with 16 end groups had greater association constants than EB; **4** showed the greatest constant among all the dendrimers studied. This indirect means of determining binding affinity may be misleading, however, because multiple mechanisms for the displacement have been suggested, including conformational changes that modify base stacking and charge repulsion between the dye and polyamine polymers.

Quenching of BSA fluorescence emission in presence of dendrimers

BSA has two tryptophan residues. One is located at the bottom of the hydrophobic pocket in subdomain IIA (Trp²¹³), and the other is on the surface of the molecule in subdomain IB (Trp¹³⁴) [50]. Three different quenchers, acrylamide, caesium chloride and potassium iodide, were used for experiments on BSA fluorescence quenching in the absence and presence of dendrimers. Acrylamide is a neutral polar quencher that can penetrate the interior of proteins by diffusion because of fluctuations in polypeptide conformation. Both tryptophanys, Trp¹³⁴ (at the BSA surface) and Trp²¹³ (in a hydrophobic pocket), are accessible to acrylamide. Ionic quenchers suppress tryptophan fluorescence by a heavy ion effect, requiring a direct collision between the ions (I^- or Cs^+) and the excited indole ring. Ionic quenchers are not expected to penetrate into the protein matrix, so they can only quench tryptophan residues are located on the protein surface [51]. Because both Trps are accessible to acrylamide the quenching results were analyzed using the Stern–Volmer equation (11).

Figure 5a shows the quenching of BSA fluorescence by acrylamide in the absence and presence of dendrimers. The quenching curves are linear. Quenching was maximal in dendrimer-free media. In the presence of N group dendrimers, the quenching process was close to that in controls. In contrast, the presence of NN group dendrimers decreased the effect of acrylamide. The quenching constants are presented in Table 3. A possible reason is the attachment of NN group dendrimers to the protein surface, generating a layer that restricts the accessibility of the protein to the quencher. N group dendrimers apparently cannot interact effectively with the protein. Figure 5b

shows the quenching of BSA fluorescence by the anionic quencher KI in the absence and presence of dendrimer. The data show that the quenching process is complex and quasi-linear; it is non-linear in the initial step (0–0.025 mol/l) but linear over the concentration range 0.025–0.15 mol/l, showing that quenching has both a static and dynamic nature. Collisional quenching is dynamic while the attachment of the quencher to the protein may be static. As for acrylamide, N and NN type dendrimers differ. N group dendrimers affect the quenching process only slightly. In contrast, the addition of NN group dendrimers at initial concentrations sharply decreases the quenching induced by KI. The explanation may be the same as for acrylamide: NN group dendrimers attached to the protein surface prevent any interaction between protein and quencher. Figure 5c shows the quenching of BSA fluorescence emission by CsCl in the absence and presence of dendrimers. As in the case of KI, the quenching process is non-linear. CsCl quenches BSA fluorescence only slightly. Addition of N group dendrimers prevented quenching while addition of NN group dendrimers led to negative quenching, i.e. the fluorescence intensity increased when CsCl was added. The most likely reason for this effect is a direct interaction between the CsCl and the NN group dendrimers.

Thus, the results show first that carboxilane dendrimers can bind small molecules. Secondly, carboxilane dendrimers can interact with DNA and displace EB from it. Thirdly, carboxilane dendrimers can bind to a protein and decrease its accessibility to other molecules. Taking into account that ODN–carboxilane dendrimer complexes do not interact with BSA [30], it can be concluded that NN group carboxilane dendrimers are good candidates for ODN and DNA delivery.

Table 3 The constants of BSA fluorescence quenching by acrylamide in the absence and presence of carboxilane dendrimers

	$K_{SV} (Ac), (mol/l)^{-1}$
No dendrimer	9.92±1.01
1	9.19±0.94
2	8.89±1.1
3	7.07±0.61
4	6.05±0.71

Acknowledgements This work was supported by grant ERA-NET MNT 2007.

References

- Duncan R, Izzo L (2005) Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv Drug Deliv Rev* 57(15):2215–2237. doi:10.1016/j.addr.2005.09.019
- Svenson S, Tomalia DA (2005) Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev* 57(15):2106–2129. doi:10.1016/j.addr.2005.09.018
- Tomalia DA (2004) Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic organic chemistry. *Aldrichim Acta* 37(2):39–57
- Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S et al (1986) Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules* 19(9):2466–2468. doi:10.1021/ma00163a029
- Tomalia DA (1995) Dendrimer molecules. *Sci Am* 272(5):42–48
- Ballauff M (2000) Dendrimers III—architecture, nanostructure and supramolecular chemistry. *Top. Curr. Chem.* 210:177–194
- Sayed-Sweet Y, Hedstrand DM, Spinder R, Tomalia DA (1997) Hydrophobically modified poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: their properties at the air–water interface and use as nanoscopic container molecules. *J Mater Chem* 7(7):1199–1205. doi:10.1039/a700860k
- Caminade AM, Laurent R, Majoral JP (2005) Characterization of dendrimers. *Adv Drug Deliv Rev* 57(15):2130–2146. doi:10.1016/j.addr.2005.09.011
- Gillies ER, Fréchet JM (2005) Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov. Today* 10(1):35–43. doi:10.1016/S1359-6446(04)03276-3
- Caminade AM, Turrin CO, Sutra P, Majoral JP (2003) Fluorinated dendrimers. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 8(3):282–295. doi:10.1016/S1359-0294(03)00051-7
- Grayson SM, Jayaraman M, Fréchet JM (1999) Convergent synthesis and ‘surface’ functionalization of a dendritic analog of polyethylene glycol. *Chem Commun Issue* 14:1329–1330. doi:10.1039/a902340b
- Tomalia DA, Berry V, Hall M, Hedstrand DM (1987) Starburst dendrimers. 4. Covalently fixed unimolecular assemblages reminiscent of spheroidal micelles. *Macromolecules* 20(5):1164–1167. doi:10.1021/ma00171a051
- Tomalia DA, Naylor AM, Goddard WA III (1990) Starburst dendrimers: molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter. *Angew Chem Int Ed Engl* 29(2):138–175. doi:10.1002/anie.199001381
- Tomalia DA, Hall M, Hedstrand DM (1987) Starburst dendrimers. 3. The importance of branch junction symmetry in the development of topological shell molecules. *J Am Chem Soc* 109(5):1601–1603. doi:10.1021/ja00239a068
- Naylor AM, Goddard WA III, Kiefer GE, Tomalia DA (1989) Starburst dendrimers. 5. Molecular shape control. *Am Chem Soc* 111(6):2339–2341. doi:10.1021/ja00188a079
- Yang H, Lopina ST (2003) Penicillin V-conjugated PEG-PAMAM star polymers. *J Biomater Sci Polym Ed* 14:1043–1056. doi:10.1163/156856203769231556
- Yang H, Lopina ST (2005) Extended release of a novel antidepressant, venlafaxine, based on anionic polyamidoamine dendrimers and poly(ethylene glycol)-containing semi-interpenetrating networks. *J Biomed Mater Res* 72A:107–114 Part A. doi:10.1002/jbm.a.30220
- Malik N, Evagorou EG, Duncan R (1999) Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs* 10(8):767–776. doi:10.1097/00001813-199909000-00010
- Wang D, Kopecek P, Mink T, Nanayakkara V, Kopecek J (2000) Synthesis of starlike N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymers: potential drug carriers. *Biomacromolecules* 1(3):313–319. doi:10.1021/bm0000236
- Patri AK, Kukowska-Latallo JF, Baker JR (2005) Targeted drug delivery with dendrimers: comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex. *Adv Drug Deliv Rev* 57(15):2203–2214. doi:10.1016/j.addr.2005.09.014
- Zhuo RX, Du B, Lu ZR (1999) In vitro release of 5-fluorouracil with cyclic core dendritic polymer. *J. Control. Release* 57:249–257. doi:10.1016/S0168-3659(98)00120-5
- D’Emmanuele A, Atwood D (2005) Dendrimer–drug interactions. *Adv Drug Deliv Rev* 57(15):2147–2162. doi:10.1016/j.addr.2005.09.012
- Kabanov VA, Zezin AB, Rogacheva VB, Gulyaeva ZG, Zansochova MF, Joosten JGH et al (1999) Interaction of Astramol poly(propyleneimine) dendrimers with linear polyanions. *Macromolecules* 32:1904–1909. doi:10.1021/ma9716443
- Li Y, Dubin PL, Spindler R, Tomalia DA (1995) Complex formation between poly(dimethyldiallylammonium chloride) and carboxylated starburst dendrimers. *Macromolecules* 28:8426–8428. doi:10.1021/ma00128a064
- Kannan S, Kolhe P, Raykova V, Glibatec M, Kannan RM, Lieh-Lai M et al (2004) Dynamics of cellular entry and drug delivery by dendritic polymers into human lung epithelial carcinoma cells. *J Biomater Sci Polym Ed* 15:311–330. doi:10.1163/15685620432297201
- Wiwattanapatapee R, Jee RD, Duncan R, (1999) PAMAM dendrimers as a potential oral drug delivery system: dendrimer complexes with piroxicam. *Proc Int Symp Control Release Bioact Mater* 145–146 (26th)
- Chauhan AS, Sridevi S, Chalasani KB, Jain AK, Jain SK, Jain NK et al (2003) Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. *J Control Release* 90:335–343. doi:10.1016/S0168-3659(03)00200-1
- Ortega P, Bermejo JF, Chonco L, de Jesus E, Javier de la Mata F, Fernández G et al (2006) Novel water-soluble carbosilane dendrimers: synthesis and biocompatibility. *Eur J Inorg Chem* 7:1388–1396. doi:10.1002/ejic.200500782
- Bermejo JF, Ortega P, Chonco L, Eritja R, Samaniego R, Müllner M et al (2007) Water-soluble carbosilane dendrimers: synthesis, biocompatibility and complexation with oligonucleotides; evaluation for medical applications. *Chem Eur J* 13:483–495. doi:10.1002/chem.200600594
- Chonco L, Bermejo-Martin JF, Ortega P, Shcharbin D, Pedziwiatr E, Klajnert B et al (2007) Water-soluble carbosilane dendrimers protect phosphorothioate oligonucleotides from binding to serum proteins. *Org Biomol Chem* 5:1886–1893. doi:10.1039/b703989a
- Shcharbin D, Pedziwiatr E, Chonco L, Bermejo-Martin JF, Ortega P, Javier de la Mata F, Eritja R, Gomez R, Klajnert B, Bryszewska M, Angeles Muñoz-Fernandez M (2007) Analysis of interaction between dendriplexes and bovine serum albumin. *Biomacromolecules* 8:2059–2062. doi:10.1021/bm070333p
- Shcharbin D, Klajnert B, Mazhul V, Bryszewska M (2003) Estimation of PAMAM dendrimers’ binding capacity by fluorescent probe ANS. *J Fluoresc* 13(6):519–524. doi:10.1023/B:JOFL.0000008063.28420.45
- Pang J-Y, Long Y-H, Chen W-H, Jiang Z-H (2007) Amplification of DNA-binding affinities of protoberberine alkaloids by appended polyamines. *Bioorg Med Chem Lett* 17(4):1018–1021. doi:10.1016/j.bmcl.2006.11.037

34. Cheng YC, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099–3108. doi:10.1016/0006-2952(73)90196-2
35. Klotz IM (1985) Ligand–receptor interactions: facts and fantasies. *Q Rev Biophys* 18:227–259
36. Tang T-C, Huang H-J (1999) Electrochemical Studies of the Intercalation of Ethidium Bromide to DNA. *Electroanalysis* 11(16):1185–1190. doi:10.1002/(SICI)1521-4109(199911)11:16<1185::AID-ELAN1185>3.0.CO;2-#
37. Lakowicz JR (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy* 2nd ed. Kluwer Academic/Plenum, New York
38. Slavik J (1982) Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim Biophys Acta* 694(1):1–25
39. Radda GK (1972) Fluorescent probes in membrane studies. *Biomembranes* 3:247–266
40. Matulis D, Baumann C, Bloomfield V, Lovrien R (1999) 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate as a protein conformational tightening agent. *Biopolymers* 49(6):451–458. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(199905)49:6<451::AID-BIP3>3.0.CO;2-6
41. Quillardet P, Hofnung M (1988) Ethidium bromide and safety—readers suggest alternative solutions. *Trends Genet* 4:89–93. doi:10.1016/0168-9525(88)90092-3
42. Tsai CC, Jain SC, Sobel HM (1977) Visualization of drug–nucleic acid interactions at atomic resolution. I. Structure of an ethidium/dinucleoside monophosphate crystalline complex, ethidium:5-iodouridylyl (3 ϵ -5 ϵ) adenosine. *J Mol Biol* 114(3):301–315. doi:10.1016/0022-2836(77)90252-2
43. Chen W, Turro NJ, Tomalia DA (2000) Using ethidium bromide to probe the interactions between DNA and dendrimers. *Langmuir* 16(1):15–19. doi:10.1021/la981429v
44. Pope LH, Davies MC, Laughton CA, Roberts CJ, Tendler SJB, Williams PM (2000) Atomic force microscopy studies of intercalation-induced changes in plasmid DNA tertiary structure. *J Microsc* 199(1):68–78. doi:10.1046/j.1365-2818.2000.00703.x
45. Lee CY, Ryu H-W, Ko T-S (2001) Binding features of ethidium bromide and their effects on nuclease susceptibility. *Bull Korean Chem Soc* 22:87–89
46. Zhao GH, Lin HK, Zhu SR, Sun HW, Chen YT (1998) Dinuclear palladium(II) complexes containing two monofunctional [Pd(en)(pyridine)Cl]⁺ units bridged by Se or S. Synthesis, characterization, cytotoxicity and kinetic studies of DNA-binding. *J Inorg Biochem* 70:219–226. doi:10.1016/S0162-0134(98)10019-3
47. Labieniec M, Gabryelak T (2006) Interactions of tannic acid and its derivatives (ellagic and gallic acid) with calf thymus DNA and bovine serum albumin using spectroscopic method. *J Photochem. Photobiol B* 82:72–78. doi:10.1016/j.jphotobiol.2005.09.005
48. Zhou Y, Li Y (2004) Studies of the interactions between poly (diallyldimethyl ammonium chloride) and DNA spectroscopic methods. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Aspects* 233:129–135. doi:10.1016/j.colsurfa.2003.11.030
49. Klajnert B, Walach W, Bryszewska M, Dworak A, Shcharbin D (2006) Cytotoxicity, haematotoxicity and genotoxicity of high molecular mass arborescent polyoxyethylene polymers with polyglycidol-block-containing shells. *Cell Biol Int* 30:248–252. doi:10.1016/j.cellbi.2005.10.026
50. Carter DC, Ho XJ (1994) Structure of serum albumins. *Adv Protein Chem* 45:153–203. doi:10.1016/S0065-3233(08)60640-3
51. Klajnert B, Stanislawski L, Bryszewska M, Palecz B (2003) Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin. *BBA* 1648:115–126

DOI: 10.1002/cmdc.201000029

Gene Therapy in HIV-Infected Cells to Decrease Viral Impact by Using an Alternative Delivery Method

Teresa Gonzalo,^[a, b] María Isabel Clemente,^[a, b] Louis Chonco,^[a, b] Nick D. Weber,^[a, b] Laura Díaz,^[a, b] María Jesús Serramía,^[a] Rafael Gras,^[a, b, c] Paula Ortega,^[b, d] F. Javier de la Mata,^[b, d] Rafael Gómez,^[b, d] Luis A. Lopez-Fernández,^[a, b, c] María Ángeles Muñoz-Fernández,^[a, b] and José Luís Jiménez^{*,[a, b]}

The ability of dendrimer 2G-[Si{O(CH₂)₂N(Me)₂}⁺(CH₂)₂NMe₃⁺ (I⁺)₂]₈ (NN16) to transfect a wide range of cell types, as well as the possible biomedical application in direct or indirect inhibition of HIV replication, was investigated. Cells implicated in HIV infection such as primary peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and immortalized suspension cells (lymphocytes), primary macrophages and dendritic cells, and immortalized adherent cells (astrocytes and trophoblasts) were analyzed. Dendrimer toxicity was evaluated by mitochondrial activity, cell membrane rupture, release of lactate dehydrogenase, erythrocyte hemolysis, and the effect on global gene expression profiles using whole-genome human microarrays. Cellular uptake of genetic material was determined using flow cytometry and confocal microscopy. Transfection efficiency and gene knock-down was investigated using dendrimer-delivered antisense

oligonucleotides and small interfering RNA (siRNA). Very little cytotoxicity was detected in a variety of cells relevant to HIV infection and erythrocytes after NN16 dendrimer treatment. Imaging of cellular uptake showed high transfection efficiency of genetic material in all cells tested. Interestingly, NN16 further enhanced the reduction of HIV protein 24 antigen release by antisense oligonucleotides due to improved transfection efficiency. Finally, the dendrimer complexed with siRNA exhibited therapeutic potential by specifically inhibiting cyclooxygenase-2 gene expression in HIV-infected nervous system cells. NN16 dendrimers demonstrated the ability to transfect genetic material into a vast array of cells relevant to HIV pathology, combining high efficacy with low toxicity. These results suggest that NN16 dendrimers have the potential to be used as a versatile non-viral vector for gene therapy against HIV infection.

Introduction

Treatment of HIV-1 infection with highly active antiretroviral therapy (HAART) has resulted in major improvements in survival rates and immune function, as well as a decrease in the incidence of opportunistic infections.^[1] Unfortunately, HAART is a complex therapy with severe side effects, including metabolic complications, liver toxicity and the appearance of drug-resistant strains. Furthermore, the currently available therapy does not reach all HIV-infected cells or viral reservoirs.^[2]

Fine-tuning the expression of genes implicated in HIV infection through the use of gene therapy is proposed to be a potential strategy to combat HIV and decrease its virulence.^[3] The targeting of highly conserved HIV sequences, or the silencing of pro-inflammatory enzymes induced by HIV infection in the brain, are promising targets for gene therapy. Selective silencing of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression, an enzyme known to be stimulated following HIV infection in the brain,^[4] may lead to novel therapies that alleviate the inflammatory disorders that often accompany viral infection. A short viral life cycle (1.5 days) and a high error rate during retro-transcription cause the virus to mutate quickly, resulting in a great deal of viral genetic variability. Some of these mutations give the virus a superior advantage over the parent virus, enabling them to bypass defenses such as the human immune system and anti-retroviral drugs. Therefore, simultaneously targeting highly conserved HIV gene sequences, and thereby disrupting the

viral cycle, could offer a significant improvement over current therapies.^[5] This multiple-target approach may prevent the emergence of escape variants and defend the infected individual against viral resistance.

To accomplish this objective, successful delivery of genetic material to the target cells is of critical importance; however, the biological barriers to drug delivery are a major obstacle. A

[a] Dr. T. Gonzalo,^{*} M. I. Clemente,^{*} L. Chonco, Dr. N. D. Weber, Dr. L. Díaz, M. J. Serramía, R. Gras, Dr. L. A. Lopez-Fernández, Dr. M. A. Muñoz-Fernández, Dr. J. L. Jiménez
Laboratory of Molecular Immunobiology, Plataforma de Laboratorio Hospital General Universitario Gregorio Marañón
C/Dr. Esquerdo 46, 28007 Madrid (Spain)
Fax: (+34) 915868018
E-mail: jjimenezf.hguym@salud.madrid.org

[b] Dr. T. Gonzalo,^{*} M. I. Clemente,^{*} L. Chonco, Dr. N. D. Weber, Dr. L. Díaz, R. Gras, Dr. P. Ortega, Dr. F. J. de la Mata, Dr. R. Gómez, Dr. L. A. Lopez-Fernández, Dr. M. A. Muñoz-Fernández, Dr. J. L. Jiménez
CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN)
Instituto de Salud Carlos III, Madrid (Spain)

[c] R. Gras, Dr. L. A. Lopez-Fernández
Laboratory of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics
Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid (Spain)

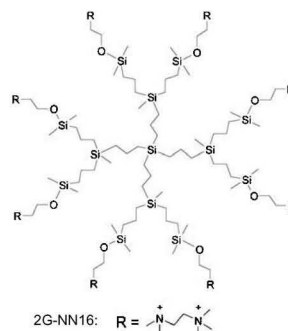
[d] Dr. P. Ortega, Dr. F. J. de la Mata, Dr. R. Gómez
Department of Inorganic Chemistry
Alcalá University, Madrid (Spain)

[*] These authors contributed equally to this work.

variety of methods have been developed to accomplish gene transfer into target cells. These techniques include direct injection into head and neck cancers of an adenoviral vector delivery system for the p53 tumor suppressor gene,^[6] the use of genetically modified viruses to deliver genetic material,^[7] the disruption of cell membranes to allow the transfer of DNA,^[8] and the formation of DNA complexes with inorganic salts, polycations, or lipids to transfer the DNA across cell membranes.^[9–12] Despite obtaining promising results, these methods have limitations such as cytotoxicity and poor cell transfection efficiency.^[11,12]

To date, many studies have indicated that cationic vectors such as liposomes, polymers, or dendrimers efficiently transfect genetic material in vitro through transient disruption of the cell membrane. Dendrimers constitute a promising approach to RNA and DNA transport and delivery to cells.^[13] Their versatility allows them to be used for a wide range of applications, from diagnostics to therapeutics.^[14,15] It has also been reported that dendrimers can be used as carriers for small interfering RNA (siRNA) to modulate gene function.^[15]

The use of siRNA is a powerful strategy against viral infections, cancer, and treatment of human genetic disorders.^[16] Due to the nature of treatment for chronic HIV infection, priority must be given to the delivery vector, in order to guarantee safe and long-term application of siRNA drugs to achieve the necessary benefits. Such vectors must ensure stability, resistance to degradation, and specific delivery of the siRNA to the target cells. To cross the cell membrane prior to delivering genetic material to the target site, our group has synthesized carbosilane dendrimers, a new class of polymers that are soluble in aqueous solutions.^[17] Experiments have demonstrated the suitability of one of these dendrimers, NN16, as a vehicle for siRNA and antisense oligonucleotides (ODN) that protects the genetic material from binding to serum proteins, thereby increasing siRNA bioavailability to the target cells.^[18] In the present study, the transfection ability of NN16 was investigated in a variety of cell types, including primary and immortalized suspension cells (lymphocytes), primary and immortalized adherent cells (macrophages), astrocytes, dendritic cells (DC), and



trophoblasts, which all play a role in the infection or pathology of HIV. The safety and efficacy of these NN16 dendrimers as therapeutic tools in anti-HIV strategy has also been explored.

Results

Dendrimers lack toxicity in primary and established cell lines

Cell membrane damage was measured by lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity following exposure to the NN16 dendrimer. NN16 (1–5 μM) was incubated for 3 h in a wide range of cell types, including primary isolated cells and cell lines (Table 1). At lower concentrations, NN16 did not induce significant LDH release (<5%). Primary isolated cells such as human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), macrophages, and DC, exhibited less than 10% cytotoxicity in the concentration range of dendrimer tested (Figure 1A). However, after evaluating effects in a number of HIV-related cell lines, a 10% increase in membrane damage was observed for 4–5 μM NN16 treatment (Figure 1B).

Table 1. Array of techniques applied to NN16 to analyze cytotoxicity, transfection efficiency, and biological effects in various cell types: adherent, in suspension, primary, and cell culture lines.

Primary and Cell Culture Lines	Cell Type	Cytotoxicity	Transfection Efficiency	Biological Effect
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells	LDH, MTT	Flow cytometry, confocal microscopy	HIV inhibition via siRNA
Macrophages	Primary isolated macrophages	LDH	–	–
Dendritic cells	Primary isolated dendritic cells	LDH, MTT	Flow cytometry, confocal microscopy	–
SupT1	Human T lymphocyte line	LDH, MTT	Flow cytometry, confocal microscopy	GAPDH silencing, HIV inhibition via siRNA*
MT-2	Human T lymphocyte line	LDH, MTT	Flow cytometry	HIV inhibition via ON
U-87-MG	Astroglia cell line	LDH, MTT	Flow cytometry, confocal microscopy	COX-2 inhibition via siRNA
SK-N-MC	Neuroblastoma cell line	LDH, MTT	Flow cytometry, confocal microscopy	–
JEG-3	Transformed trophoblastic cell line	MTT	Flow cytometry, confocal microscopy	–
JAR	Transformed trophoblastic cell line	MTT	Flow cytometry, confocal microscopy	–
K562	Human erythroleukemia cell line	LDH	–	–
Erythrocytes	Primary isolated erythrocytes	Hemolysis	–	–

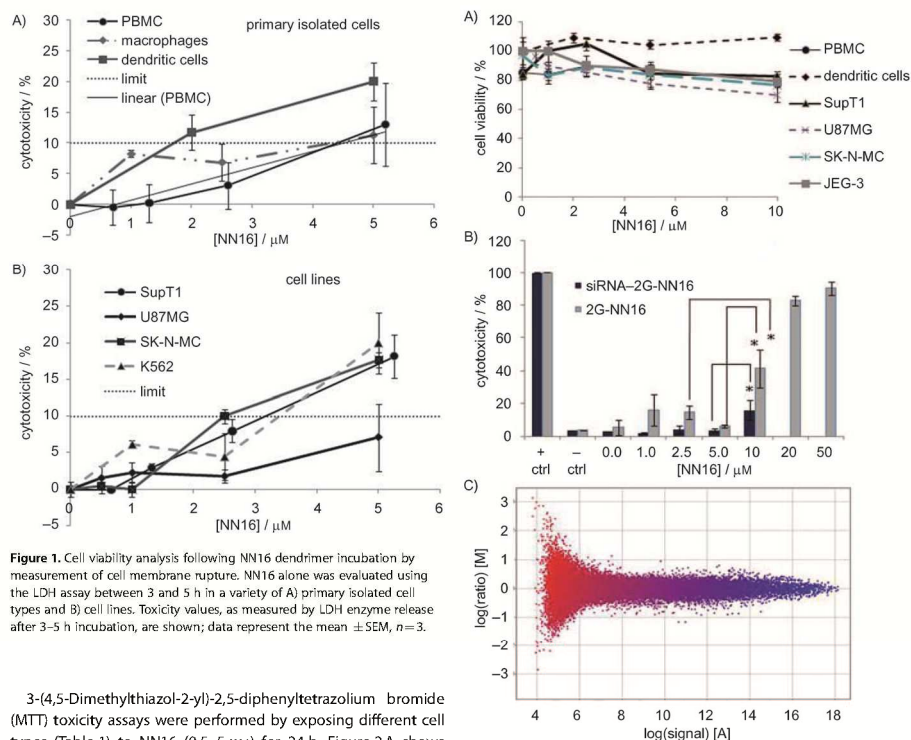


Figure 1. Cell viability analysis following NN16 dendrimer incubation by measurement of cell membrane rupture. NN16 alone was evaluated using the LDH assay between 3 and 5 h in a variety of A) primary isolated cell types and B) cell lines. Toxicity values, as measured by LDH enzyme release after 3–5 h incubation, are shown; data represent the mean \pm SEM, $n=3$.

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) toxicity assays were performed by exposing different cell types (Table 1) to NN16 (0.5–5 μM) for 24 h. Figure 2A shows that MTT activity was above 80% for up to 5 μM NN16, suggesting that the dendrimer was not toxic at that concentration in all cell types tested. Both assays indicated that the ideal maximum NN16 concentration should be 5 μM for evaluating the dendrimer as an *in vitro* cell transfectant. Furthermore, an erythrocyte hemolysis assay was conducted to test the biocompatibility of NN16. Figure 2B shows the absence of toxicity of NN16 (1–5 μM), both alone and in complex with siRNA. There was no significant hemoglobin release until the dendrimer concentration reached 10 μM (20–40% hemoglobin release), where the toxic effect was observed to be shielded by the complexed siRNA.

Next, we investigated the effect of NN16 in a human astrogloma cell line (U87MG) global gene expression profile using Agilent 4 \times 44K whole-genome human microarrays. Analysis of microarrays from U87MG exposed to 5 μM NN16, as compared with untreated U87MG, did not reveal any statistically significant gene expression variation, with 0.66 as the lowest adjusted p value obtained by Limma software (Figure 2C). The lack of variation in the gene expression profile from control cells was further evidence that NN16 did not have a negative effect on the astrocyte cell line.

Figure 2. Effect of NN16 on intracellular mitochondrial activity, erythrocyte viability, and gene profile in cells. A) NN16 alone was evaluated using the MTT assay following 24 h incubation with a variety of cell lines, including PBMC. B) Hemolysis assay of NN16 alone and NN16/siRNA effect on hemoglobin release following incubation of dendrimer with erythrocytes; data represent the mean \pm SEM, $n=3$ * $p < 0.05$. C) Microarray gene profiles for dendrimer-treated U87MG.

Transfection efficiency of SNA in primary and established cell lines

Transfection efficiency of NN16 in different cell cultures was analyzed using flow cytometry (Table 1). Delivery of short nucleic acids (SNA), including antisense oligonucleotides and siRNA complexed with NN16 dendrimers, was facilitated by the incubation of NN16 with the various cells. Efficiency of NN16-mediated, fluorochrome-labeled SNA entry was evaluated by the percentage of viable cells that exhibited fluorescence in the cytosol. This percentage represented successful uptake of fluorochrome-labeled SNA. Primary isolated cells such as PBMC or DC, showed a 40% uptake, as shown in Figure 3A and B.

Cell lines showed a linear relationship between NN16 concentration and genetic material uptake. An increase in NN16

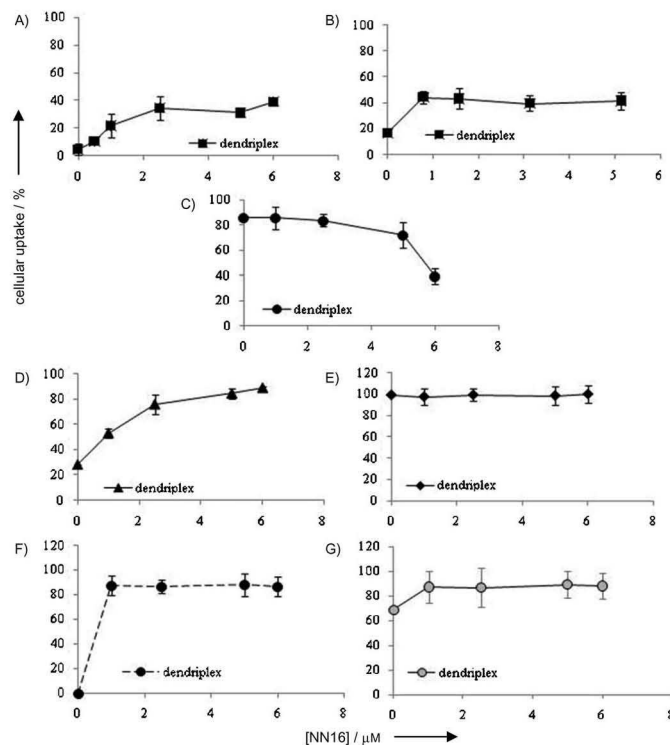


Figure 3. Cellular uptake efficiency of the SNA-NN16 complex. Percentage of cellular uptake was measured by flow cytometry relative to NN16 (range 0–6 μM): A) primary isolated PMBC lymphocytes, B) primary DC, C) SupT1 lymphocyte line, D) astrocyte U87MG cell line, E) neuroblastoma SK-N-MC cell line, F) trophoblast JAR cell line, and G) trophoblast JEG-3 cell line. Data represent the mean \pm SEM; $n=3$.

correlated with a proportional improvement in transfection efficiency. This trend was observed after incubation of either fluorescent oligonucleotide or siRNA, complexed with NN16, in different cell lines. NN16-mediated transfection efficiency attained very high levels (90%) in lymphocytes (SupT1), astroglia (U87MG), neuroblastoma (SK-N-MC), and transformed trophoblastic (JEG-3 and JAR) cell lines, beginning at 1 μM NN16 (Figure 3C–G).

Confocal studies of NN16 transfection

To further analyze the results obtained by flow cytometry, the delivery of fluorochrome-labeled siRNA or antisense oligonucleotide by NN16 was visualized for a variety of different primary cells and cell lines using scanning confocal microscopy. Different ratios were used according to each cell type. Cellular

uptake of the antisense oligonucleotide sRev by PBMC transfected with dendriplex can be observed in Figure 4. In contrast with control cells (Figure 4A), the green fluorescent oligonucleotide can be visualized in the interior of a majority of the cells (Figure 4B). The superimposition of multiple images enabled simultaneous visualization of the cell membrane, nuclei and transfected oligonucleotide (Figure 4C–D), providing a complete view of the efficiently transferred genetic material. As shown in Figure 5, immature and mature human dendritic cells (iDC and DC, respectively) exhibited high transfection efficiency of nucleotides by NN16 dendrimer, for which an improvement in green fluorescence by FITC is observed for both iDC and DC when the HIV-1 gene expression modulator 91 (GEM91) oligonucleotide is bound to NN16. Phase contrast images showed that incubation with the dendriplex does not damage cell viability.

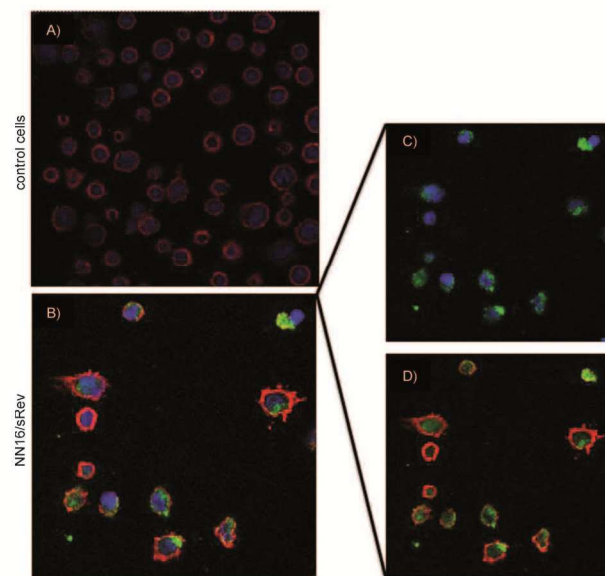


Figure 4. Dendriplex-transfected PMBC cells visualized by confocal microscopy. Fluorescently labeled, NN16-transfected antisense oligonucleotide sRev: A) control cells, B) superimposition of images from transfection of dendriplex sRev/NN16, C) dendriplex sRev/NN16 with labeled cell nuclei, and D) dendriplex sRev/NN16 with cell membrane labeled. Cell membranes are labeled with Texas Red™ (red); cell nuclei are labeled with DAPI (blue); the antisense oligonucleotide REV is labeled with FITC (green).

Down-regulation of gene expression using siRNA/NN16 dendriplex in astroglia cells

The silencing of genes to selectively modulate their function constitutes an advantageous tool for gene therapy. Therefore, the efficiency of siRNA was further studied after transfection by NN16 in the U87MG cell line. Inhibition of COX-2 gene expression was investigated using dendriplexes containing various ratios of COX-2 siRNA, and was compared with dendriplexes composed of random siRNA as a control. As shown in Figure 6E, incubation with HIV led to twofold higher induction of COX-2 in astroglia cells relative to non-infected control cells. Dendriplexes containing random siRNA did not affect COX-2 levels; however, the inclusion of a siRNA pool of COX-2 did decrease gene expression levels. A 2:1 ratio of siRNA:COX-2/NN16 showed slight inhibition, while a ratio of 10:1 decreased COX-2 gene expression to basal levels.

Decrease in levels of HIV p24 antigen release mediated by antisense oligonucleotides, alone or in the presence of dendriplex

HIV-1 inhibition assays were performed using antisense oligonucleotides, either alone or complexed with NN16. Evaluation of HIV p24 antigen release via ELISA was performed using culture supernatants of an HIV-infected human lymphocyte T-cell line (MT-2) and a primary isolated PBMC that were incubated with different treatments. NN16 alone was not able to inhibit infection in HIV-infected cells (data not shown). Antisense oligonucleotides of HIV-1 anti-transactivation responsive gene (TAR) and GEM91 alone were able to decrease p24 antigen release by 20%, which was further improved by the dendriplex NN16/TAR/GEM91 to a reduction of 60% antigen release (Figure 6A). The same dendriplex combination in MT-2 cells led to a p24 antigen level reduction of 40% (Figure 6B), with a similar effect observed when the dendriplex was composed of the TAR oligonucleotide alone (Figure 6C). However, the NN16/TAR/sRev dendriplex reduced p24 antigen levels by 60%, relative to 20% achieved by the oligonucleotides alone, as shown in Figure 6D.

Discussion

One of the major goals of the present manuscript was to study the biomedical application of NN16 dendrimers as an anti-HIV strategy. A major function of dendrimers as non-viral vectors may be to act as transfectants for a wide range of cell types implicated in HIV infection. The suitability of carboxylate dendrimers as cell transfectants has been consistently supported by our experimentation, suggesting that NN16 might be a promising tool for gene therapy.

In the present work, the applicability of carboxylate dendrimers for antisense oligonucleotide and siRNA transport, protection, and efficient delivery to the target cells was thoroughly analyzed. Previous studies have demonstrated the advantageous complexation and protection that dendrimer interaction offers to oligonucleotides and siRNA for transport and delivery.^[19–21] Now, NN16 dendrimers have been proven to successfully mediate transfection of siRNA or antisense oligonucleotides in an array of primary cells and cell lines essential for anti-HIV research. NN16-mediated gene internalization is readily visualized in primary isolated human lymphocytes, as well as mature and immature ex vivo human DC. Furthermore, lower toxicity was observed for transfection of the dendriplex, although it was an efficient transfectant in many cell types. The

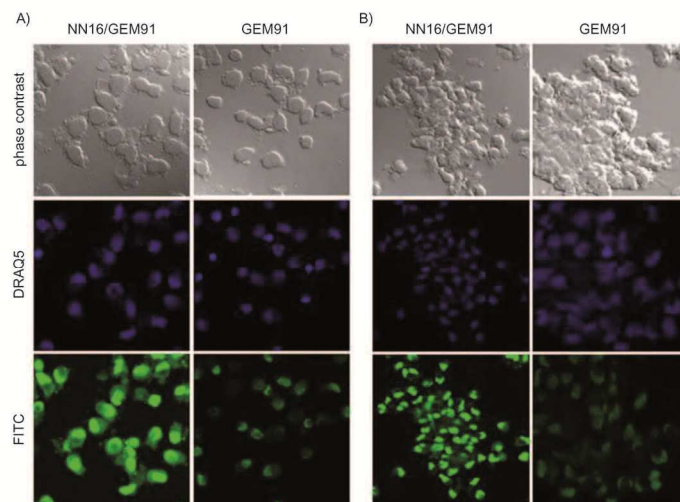


Figure 5. Dendriplex-transfected ex vivo human iDC and DC, visualized by confocal microscopy. A) Fluorescently labeled iDC transfected with antisense oligonucleotide GEM91 alone or in complex with NN16. B) Mature DC transfected with GEM91/NN16 or GEM91 alone. Phase contrast was used as a control for cell viability; cell nuclei were labeled with DRAQ5 (blue) and GEM91 labeled with FITC (green).

absence of erythrocyte damage caused by NN16 or dendriplexes at working concentrations demonstrates the biocompatibility of NN16 dendrimers, which ultimately may be used for in vivo applications. Moreover, the lack of variation in the gene expression profile from control cells was further evidence that NN16 did not affect the astrocyte cell line in any negative way. Various primary cultures or established cell lines transfected with SNA-dendrimer complexes exhibited enhanced transfection efficiency over naked genetic material. Relative to nucleic acids alone, dendrimers increased and prolonged siRNA or antisense nucleotide uptake into whole cells.

Traditionally, primary isolated cells exhibit more resistance to transfection by vectors, which is overcome by dendrimers exhibiting moderate transfection efficiency. In cell lines, NN16 facilitated nearly total internalization of the siRNA. While delivery of genetic material into cells has been accomplished by other researchers^[22] using methods such as cationic lipids embedded in liposomes,^[23] lipoplexes,^[24] polymers acting via an acid-sensitive linker,^[25] polymeric nanocapsules,^[26] chitosan colloidal carriers^[27] or peptide transduction domains such as a TAT peptide^[28] or RGD peptide,^[29] the obstacle is to obtain entrance into the cell and carry out the desired function. In the present paper, NN16 facilitated the entry of genetic material into infected nervous system cells where expression of the target gene, COX-2, was decreased. Furthermore, NN16 dendrimers specifically enhanced the reduction of p24 antigen release by

antisense oligonucleotides due to improved transfection efficiency. Targeting regions that are critical for HIV replication such as TAR, which is essential for activation of HIV-1 transcription; REV, which is critical for viral replication,^[30] or GEM91, which affects viral entry and reverse transcription,^[31] may disrupt the viral cycle and pose new options for HIV therapy.

In summary, a water-soluble, biocompatible NN16 dendrimer was observed to be a successful vehicle for transport and delivery of genetic material to a wide range of cell types in an effective manner. In addition, NN16 exhibited less cytotoxicity in vitro while maintaining efficient transfection levels in many cell types, including primary (PBMC) and immortalized suspension cells (lymphocytes), primary macrophages and DC, and immortalized adherent cells (astrocytes and trophoblasts), all of which play key roles in the infection or pathology of HIV. In addition, dendrimers may be used as therapeutic tools for delivering specific SNA to modulate gene expression in target cells. The biocompatibility of NN16 dendrimers may enable their use for in vitro and in vivo gene therapy delivery. Development of effective and safe medicines via specific anti-HIV gene therapy could provide alternatives for tailored HIV treatments that may be able to minimize the problems with currently available antiviral drugs and HAART treatment such as viral resistance and escape.

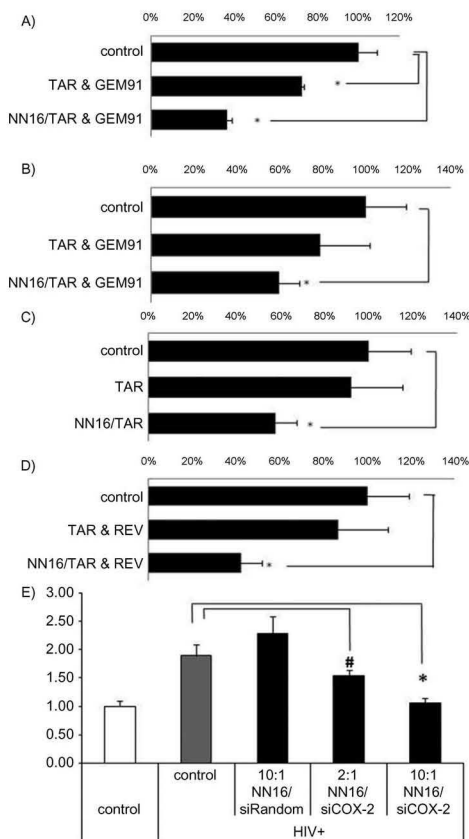


Figure 6. HIV replication inhibition by NN16-mediated cell delivery of ODN or siRNA to HIV-infected cells. Reduction levels of p24 antigen release by dendriplexes composed of TAR, GEM91, or REV antisense oligonucleotides with NN16: A) PBMC primary isolated cells, B–D) MT-2 cell line, E) inhibition efficacy of COX-2 gene expression measured by quantitative real-time PCR; a dendriplex composed of siRNA COX-2 with NN16 in the U87MG cell line and random siRNA were used as comparative controls; data represent the mean \pm SEM, $n=3$, * $p=0.05$, $p<0.05$.

Experimental Section

Primary cell cultures

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from healthy voluntary donors,^[32] and isolated from leukophoresed blood by FicollTM gradient (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) and elutriation centrifugation. PBMC were stimulated for 48 h with phytohemagglutinine ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) and interleukin-2 (IL-2; 100 IU mL^{-1}). After washing with phosphate-buffered saline (PBS), cells were seeded in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) with 10%

fetal calf serum (FCS), 1% L-glutamine, antibiotics, and 50 IU mL^{-1} IL-2, in a 5% CO_2 environment at 37°C . Macrophages were isolated from PBMC cells mechanically, and cultured as above. Dendritic cells (DC) were separated with anti-human CD14 monoclonal antibody-coated MicroBeads using MACS columns (Miltenyi Biotec, Germany). Purified monocytes were suspended in RPMI containing 5% FCS, 100 U mL^{-1} penicillin G, and $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin (Sigma-Aldrich). Monocytes were cultured with 50 ng mL^{-1} granulocyte colony-stimulating factor or 20 ng mL^{-1} interleukin-4 (ImmunoTools, Germany) in conditions as described above. Medium containing granulocyte colony-stimulating factor and IL-4 was added to the immature DC (iDC) culture every two days. iDC were matured using 20 ng mL^{-1} lipopolysaccharide (Sigma-Aldrich) for the last two days. iDC and mature DC were tested for immature or mature markers by flow cytometry (Epics XL-MCL, Beckman Coulter) and analyzed by CXP software (Beckman Coulter).

Cell lines

Established cell lines MT-2 and SupT1 (human leukemia T-lymphocytes, ATCC), U87MG (human astrogloma cell line, ATCC), SK-N-MC (peripheral neuroblastoma cell line, ATCC), JAR^[33] (transformed trophoblastic cell line, HTB 144, ATCC) and JEG-3^[34] (transformed trophoblastic cell line, HTB 36, ATCC) were maintained in RPMI 1640 medium (Biochrom AG, Germany), supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich Quimica SA, Spain), 2 mM glutamine (Lonza, Belgium), 1% ampicillin (Laboratorios Normon, Spain), 1% cloxacillin (Laboratorios Normon, Spain), 0.32% gentamycin (Schering-Plough, Spain), 10 mM HEPES (Lonza, Belgium), 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich) and 4.5 g L^{-1} glucose (Sigma-Aldrich Quimica SA, Spain) at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere.

Dendrimers

Carbosilane dendrimers were synthesized as previously reported and obtained as water-soluble white solids.^[17]

Dendriplex formation with short nucleic acids

Dendriplexes were formed by mixing equal volumes of dendrimers and short nucleic acids (SNA). Dendriplexes were dissolved in Optimem[®] medium (Invitrogen), free of serum or antibiotics at concentrations dependent on the $+/-$ charge ratio. For fluorescent uptake studies, SNA were 5'-labeled with fluorescein or fluorochrome cyanine 3. The sequence of phosphorothioate oligonucleotides corresponded to an antisense sequence of the HIV-1 regulatory gene that increases HIV replication (Rev) mRNA, HIV-1 gene expression modulator 91 (GEM91) mRNA, or HIV-1 anti-transactivation responsive gene (TAR) mRNA (Eurogentec, Belgium).

Rev: 5'-(FITC)-TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTCTCTGCCA-3'

GEM91: 5'-(FITC)-CTCTCGCACCCATCTCTCTCTCT-3'

Anti-TAR: 5'-(FITC)-CTCCCAGGCTCAGATCT-3'

Random: 5'-(FITC)-CTTCCTAGGCTCCGTTCTCGCC-3'

siRNA p24(antisense): 5'-(Cy3)-GAUUGUACUGAGACAGGCU-3'

Cytotoxicity assays

Lactate dehydrogenase assay

Measurement of cell membrane rupture and release of lactate dehydrogenase (LDH) was assessed using the CytoTox96 Assay Kit (Promega), as described previously.^[21] Measurements were normalized between the control treatment and the Triton X-100 (0.1% w/v) control. A toxicity limit was set at 10% LDH release.

Percent cytotoxicity = [(experimental LDH release) - (LDH release negative control cells)] × 100 / [(LDH release positive control cells) - (LDH release negative control cells)].

Mitochondrial and metabolic activity assay

The 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) method was selected to analyze detrimental intracellular effects on mitochondria and metabolic activity. Following 24 h incubation with a range of dendrimer concentrations, the effects on cell viability were evaluated as previously described.^[21]

Erythrocyte hemolysis assay

Erythrocytes were obtained from leukophoresed blood by FicollTM gradient and elutriation centrifugation after separation from PBMC. Erythrocytes were treated with dendrimer, dendriplex or controls Triton X-100 (0.2%) and PBS. Supernatant was evaluated for hemolysis, cell number, and hemoglobin release levels using a BioWhittaker microplate reader 2001[®] (Innogenetics, Belgium) at λ_{550} and 690 nm.

Microarray gene profiles for dendrimer-treated astroglia cell line

U87MG cells were incubated with 5 μ M NN16 for 3 or 5 h. RNA was extracted using the RiboPure-Kit (Ambion) and measured in a Nanodrop[®] ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer. RNA integrity was verified using a 2100 Bioanalyzer (Agilent). Each 1 μ g sample of total RNA was amplified using the Low RNA Amplification Plus Kit One Color (Agilent). The RNA was denatured and reverse transcribed to cDNA, then transcribed to RNA using T7 RNA polymerase. Amplified RNA was purified using the RNeasy MiniKit (Qiagen, The Netherlands). Hybridization and scanning of microarrays (G2565BA scanner, Agilent) were performed as specified in "One-color microarray-based gene expression analysis," v. 5.0.1, using 4 × 44K whole-genome human microarrays (Agilent). Data were obtained using Feature Extraction v. 9.1, with Bioconductor software used for normalization and statistical analysis.

Flow cytometry

Following treatment with dendriplexes or SNA alone, cells were analyzed by flow cytometry to determine the percentage of the viable cell population that exhibited fluorescence representing successful uptake of the fluorescein-labeled SNA. Flow cytometry was carried out with an Epics XL-MCL instrument (Beckman Coulter).

Confocal microscopy

PBMC, DC and iDC were treated and transferred to glass slides coated with Poly-L-lysine, then fixed with 3% paraformaldehyde. PBMC cells were labeled with a primary anti-CD45 mouse anti-human monoclonal antibody (Becton Dickinson), washed with PBS, and incubated with a secondary antibody (Texas RedTM dye-conjugated, Jackson ImmunoResearch). DC and iDC were treated with nuclei label marker DRAQ5TM (Biostatus Limited, UK) and ODN GEM91 labeled with FITC. PBMC cells were treated with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPITM, Vysys) to label the nucleus, while the ODN sRev was labeled with FITC. Images were captured using a Leica TCS SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Germany) at λ_{exc} : 405, 488 and 514 nm.

Inhibition efficacy via siRNA delivery

A combination of four highly potent siRNAs of COX-2 (SMARTpool technology, Dharmacon Inc.) was used to selectively silence COX-2 gene expression. Pooling decreases the concentration of each individual siRNA, a widely accepted strategy for reducing off-target effects.^[35] A random sequence of siRNA was used as a negative control. Antisense sequences of siGENOME ON-TARGETplus of siRNA COX-2 (Dharmacon Inc.) were as follows:

(1) 5'-UAACAUUACCCUAAGUCCUU-3'

(2) 5'-CAUCUCUCCAUCAUUUACUU-3'

(3) 5'-UGUCUAGCCAGAGUUUACUU-3'

(4) 5'-AACUCAUAAUUGCAUUUCUU-3'

RNA isolation and gene expression analysis

RNA isolation was performed as described above. Quantitative real-time PCR was performed in triplicate on a MX3005P system (Stratagene); mRNA of COX-2 gene, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a housekeeping gene, were measured using the Brilliant SYBR Q-PCR Master Mix[®] (Stratagene). Oligonucleotide primers (Eurogentec SA, Belgium) were as follows:

COX-2: 5'-TCTGGTCCCTGGTCTGATGATGA-3' (forward)

5'-CAGAAGGGGATGCCAGTGATAGAG-3' (reverse);

GAPDH: 5'-TGGGGAAGGTGAAGGTCGG-3' (forward)

5'-GGGATCTCGCTCTCGGAAG-3' (reverse)

PCR reactions consisted of 40 cycles (denaturation 30 s 95 °C, annealing 45 s 60 °C, extension 1 min 72 °C). The relative amount of PCR products was calculated by the comparative threshold cycle (CT) method. Data were analyzed using SDS software v. 2.1 (Applied Biosystems).

Enzyme immunoassay

After infecting cells at 0.05 multiplicity of infection with HIV isolate NL4-3, the cells were supplemented with IL-2 (50 U mL⁻¹). ODN alone or ODN-dendrimer complex was added to the cells. The supernatant was collected at 24 h to evaluate antigen viral protein p24 by InnostestTM HIV Antigen mAb (Innogenetics, Belgium). Dextran sulfate (Sigma-Aldrich) was used as a control.

Statistical analysis

Results are expressed as the mean of at least three independent experiments \pm SD, unless otherwise indicated. Statistical analysis was performed with an unpaired Student's *t*-test, with differences were considered significant at *p* < 0.05.

Acknowledgements

We acknowledge the Spanish HIV BioBank of the Spanish AIDS Research Network (RIS) and collaborating centers for the generous gifts of the samples used. This work was supported by grants from MNT-ERA NET 2007 (NAN2007-31198-E), Red Temática de Investigación Cooperativa Sanitaria ISCIII (RETIC RD06/0006/0035), Fondos de Investigación Sanitaria (FIS PI061479), Fundación para la Investigación y Prevención del SIDA en España, FIPSE (24632/07), Fundación Caja Navarra, and Comunidad Autónoma de Madrid (S-SAL-0159-2006) to M.A.M.F. Authors from the Universidad de Alcalá were supported by MNT-ERA NET 2007 (NAN2007-31133-E) and Fondo de Investigación Sanitaria (PI080222). Additional support from FIS PI081495 and the Miguel Servet Program (FIS – Comunidad de Madrid) was given to J.L.J., and from FIS CP06/0267 and the Miguel Servet Program to L.A.L.F. M.I.C. is the recipient of a fellowship from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FI0501093).

Keywords: cell transfection • delivery • dendrimers • gene therapy • HIV-infected cells

- [1] F.J. Palella, Jr., K. M. Delaney, A. C. Moorman, M. O. Loveless, J. Fuhrer, G. A. Satten, D. J. Aschman, S. D. Holmberg, *New Engl. J. Med.* **1998**, *338*, 853–860.
- [2] A. Alexaki, Y. Liu, B. Wigdahl, *Curr. HIV Res.* **2008**, *6*, 388–400.
- [3] F. Kirchhoff, *Cell* **2008**, *134*, 566–568.
- [4] A. Blanco, S. Alvarez, M. Fresno, M. A. Muñoz-Fernández, *J. Immunol.* **2008**, *180*, 530–540.
- [5] M. L. Yeung, Y. Bennasser, S. Y. Le, K. T. Jeang, *Cell Regul. Cell Res.* **2005**, *15*, 935–946.
- [6] S. Pearson, H. Jia, K. Kandachi, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 3–4.
- [7] M. T. Lee, G. A. Coburn, M. O. McClure, B. R. Cullen, *J. Virol.* **2003**, *77*, 11964–11972.
- [8] I. S. Zuhorn, D. Kalicharan, G. T. Robillard, D. Hoekstra, *Mol. Ther.* **2007**, *15*, 946–953.
- [9] B. Ma, S. Zhang, H. Jiang, B. Zhao, H. Lv, *J. Controlled Release* **2007**, *123*, 184–194.
- [10] R. I. Mahato, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 699–712.
- [11] A. Hirko, F. Tang, J. A. Hughes, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1185–1193.
- [12] D. Niculescu-Duvaz, J. Heyes, C. J. Springer, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1233–1261.
- [13] M. Guillot-Nieckowski, D. Joester, M. Stohr, M. Losson, M. Adrian, B. Wagner, M. Kansy, H. Heinzelmann, R. Pugin, F. Diederich, J. L. Gallani, *Langmuir* **2007**, *23*, 737–746.
- [14] J. Haensler, F. C. Szoka, Jr., *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 372–379.
- [15] Y. Inoue, R. Kurihara, A. Tsuchida, M. Hasegawa, T. Nagashima, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, O. Okitsu, *J. Controlled Release* **2008**, *126*, 59–66.
- [16] G. A. Coburn, B. R. Cullen, *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 753–756.
- [17] P. Ortega, J. F. Bermejo, L. Chonco, E. de Jesus, F. J. de la Mata, G. Fernandez, J. C. Flores, R. Gómez, M. J. Serramia, M. Muñoz-Fernández, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *7*, 1388–1396.
- [18] D. Shcharbin, E. Pedziwiatr, L. Chonco, J. F. Bermejo-Martín, P. Ortega, F. J. de la Mata, R. Eritja, R. Gómez, B. Kijahert, M. Bryszewska, M. A. Muñoz-Fernández, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2059–2062.
- [19] L. Chonco, J. F. Bermejo-Martín, P. Ortega, D. Shcharbin, E. Pedziwiatr, B. Kijahert, F. J. de la Mata, R. Eritja, R. Gómez, M. Bryszewska, M. A. Muñoz-Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1886–1893.
- [20] J. F. Bermejo, P. Ortega, L. Chonco, R. Eritja, R. Samanlego, M. Müllner, E. de Jesus, F. J. de la Mata, J. C. Flores, R. Gómez, A. Muñoz-Fernández, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 483–495.
- [21] N. Weber, P. Ortega, M. I. Clemente, D. Shcharbin, M. Bryszewska, F. J. de la Mata, R. Gómez, M. A. Muñoz-Fernández, *J. Controlled Release* **2008**, *132*, 55–64.
- [22] L. A. Dailey, E. Kleemann, T. Merdan, H. Petersen, T. Schmehl, T. Gessler, J. Hanz, W. Seeger, T. Kissel, *J. Controlled Release* **2004**, *100*, 425–436.
- [23] E. Mastrobattista, R. H. Kapel, M. H. Eggenhuisen, P. J. Roholl, D. J. Crommelin, W. E. Hennink, G. Storm, *Cancer Gene Ther.* **2001**, *8*, 405–413.
- [24] G. L. Scherphof, G. Koning, M. Bartsch, X. Yan, J. Kamps, *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2002**, *7*, 251–254.
- [25] N. Lavignac, J. L. Nicholls, P. Ferruti, R. Duncan, *Macromol. Biosci.* **2008**.
- [26] K. A. Janes, M. P. Fresneau, A. Marazuela, A. Fabra, M. J. Alonso, *J. Controlled Release* **2001**, *73*, 255–267.
- [27] M. V. Lozano, D. Torrecilla, D. Torres, A. Vidal, F. Domínguez, M. J. Alonso, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2186–2193.
- [28] J. S. Pappalardo, V. Quattrocchi, C. Langiotti, S. Di Giacomo, V. Gnazzo, V. Olivera, G. Calamante, P. I. Zamorano, T. S. Levchenko, V. P. Torchilin, *J. Controlled Release* **2009**, *134*, 41–46.
- [29] G. A. Koning, R. M. Schiffelers, M. H. Wauben, R. J. Kok, E. Mastrobattista, G. Moles, T. L. ten Hagen, G. Storm, *Arthritis Rheum.* **2006**, *54*, 1198–1208.
- [30] M. Gottfredsson, P. R. Bohjanen, *Front. Biosci.* **1997**, *2*, 619–634.
- [31] J. J. Turner, M. Fabiani, A. A. Arzumanov, G. Ivanova, M. J. Gait, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 290–300.
- [32] I. Garcia-Merino, N. de Las Cuevas, J. L. Jiménez, J. Gallego, C. Gómez, C. Prieto, M. J. Serramia, R. Lorente, M. A. Muñoz-Fernández, *Retrovirology* **2009**, *6*, 27.
- [33] R. A. Pattillo, G. O. Gey, *Cancer Res.* **1968**, *28*, 1231–1236.
- [34] M. J. Siciliano, M. E. Bordon-Riser, R. S. Freedman, P. O. Kohler, *Cancer Res.* **1980**, *40*, 283–287.
- [35] A. L. Jackson, J. Burchard, D. Leake, A. Reynolds, J. Schelter, J. Guo, J. M. Johnson, L. Lim, J. Karpilow, K. Nichols, W. Marshall, A. Khvorova, P. S. Linsley, *RNA* **2006**, *12*, 1197–1205.

Received: January 21, 2010
 Revised: March 5, 2010
 Published online on April 22, 2010

Publicaciones en preparación

*Sánchez-Nieves J, Chonco L, Rasines B, de la Mata, Gómez R and Muñoz-Fernández MA. **Anionic Carbosilane Dendrimers: Synthesis and Antiviral Activity.***

*Chonco L, Rasines B, López L, Sánchez Nieves J, de la Mata FJ, Rellosó M, Gómez R and Muñoz-Fernández MA. **HIV sexual transmission blockade based on current carbosilane dendrimer nanotechnology.***

Patentes

NUEVOS DENDRÍMEROS CARBOSILANOS, SU PREPARACIÓN Y SUS USOS.

Pat. P200501810, 2005. P. Ortega, J. F. Bermejo, L. Chonco, E. de Jesús, F. J. de la Mata, G. Fernández, J. C. Flores, R. Gómez, M^a J. Serramía and M^a A. Muñoz-Fernández. Premiada en 2008 por el Consejo Social de la Universidad de Alcalá de Henares (Madrid).

DENDRÍMEROS CARBOSILANOS Y SU USO COMO ANTIVIRALES.

Pat. P201030233, 2010. L. Chonco, B. Rasines, J. Sanchez-Nieves, E. Arnaiz, F. J. de la Mata, R. Gómez, M^a J. Serramía and M^a A. Muñoz-Fernández

DENDRÍMEROS CARBOSILANOS CON UN NÚCLEO POLIFENÓLICO Y SU USO COMO ANTIVIRALES. Pat. P201030450, 2010. J. Sánchez-Nieves, L. Chonco, P. Ortega, F. J. de la Mata, R. Gómez, M^a J. Serramía and M^a A. Muñoz-Fernández



8. BIBLIOGRAFIA

1. (2010). Informe de perspectivas del ONUSIDA 2010 (www.cinu.mx).
2. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A. (2005). *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press.
3. Levy, J.A. (1993). HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS* 7, 1401-1410.
4. Gilbert, P.B., McKeague, I.W., Eisen, G., Mullins, C., Gueye, N.A., Mboup, S., and Kanki, P.J. (2003). Comparison of HIV-1 and HIV-2 infectivity from a prospective cohort study in Senegal. *Stat Med* 22, 573-593.
5. Reeves, J.D., and Doms, R.W. (2002). Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol* 83, 1253-1265.
6. Sharp, P.M., Shaw, G.M., and Hahn, B.H. (2005). Simian immunodeficiency virus infection of chimpanzees. *J Virol* 79, 3891-3902.
7. Greene, W.C., and Peterlin, B.M. (2002). Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 8, 673-680.
8. Weber, J., Tatoud, R., and Fidler, S. (2010). Postexposure prophylaxis, preexposure prophylaxis or universal test and treat: the strategic use of antiretroviral drugs to prevent HIV acquisition and transmission. *AIDS* 24 Suppl 4, S27-39.
9. Karim, S. (2010). Effectiveness of 1% Tenofovir Vaginal Microbicide Gel in South African Women: Results of the CAPRISA 004 Trial. XVIII International AIDS Conference. Vienna: 2010.
10. Rerks-Ngarm, S., Pitisuttithum, P., Nitayaphan, S., Kaewkungwal, J., Chiu, J., Paris, R., Premisri, N., Namwat, C., de Souza, M., Adams, E., et al. (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 361, 2209-2220.
11. Gray, R.H., Kigozi, G., Serwadda, D., Makumbi, F., Watya, S., Nalugoda, F., Kiwanuka, N., Moulton, L.H., Chaudhary, M.A., Chen, M.Z., et al. (2007). Male circumcision for HIV prevention in men in Rakai, Uganda: a randomised trial. *Lancet* 369, 657-666.
12. Dieffenbach, C.W., and Fauci, A.S. (2009). Universal voluntary testing and treatment for prevention of HIV transmission. *JAMA* 301, 2380-2382.
13. Quinn, T.C., Wawer, M.J., Sewankambo, N., Serwadda, D., Li, C., Wabwire-Mangen, F., Meehan, M.O., Lutalo, T., and Gray, R.H. (2000). Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* 342, 921-929.
14. Granich, R.M., Gilks, C.F., Dye, C., De Cock, K.M., and Williams, B.G. (2009). Universal voluntary HIV testing with immediate antiretroviral therapy as a strategy for elimination of HIV

- transmission: a mathematical model. *Lancet* 373, 48-57.
15. Luetkemeyer, A.F., Havlir, D.V., and Currier, J.S. (2010). Complications of HIV disease and antiretroviral treatment. *Top HIV Med* 18, 57-65.
 16. (2010). Centers for Disease Control and Prevention (<http://www.cdc.gov>).
 17. Shattock, R.J., and Moore, J.P. (2003). Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol* 1, 25-34.
 18. Des Jarlais, D.C., Friedman, S.R., and Stoneburner, R.L. (1988). HIV infection and intravenous drug use: critical issues in transmission dynamics, infection outcomes, and prevention. *Rev Infect Dis* 10, 151-158.
 19. Mofenson, L.M. (2010). Protecting the next generation--eliminating perinatal HIV-1 infection. *N Engl J Med* 362, 2316-2318.
 20. das Neves, J., Amiji, M.M., Bahia, M.F., and Sarmiento, B. (2010). Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 458-477.
 21. Mamo, T., Moseman, E.A., Kolishetti, N., Salvador-Morales, C., Shi, J., Kuritzkes, D.R., Langer, R., von Andrian, U., and Farokhzad, O.C. (2010). Emerging nanotechnology approaches for HIV/AIDS treatment and prevention. *Nanomedicine (Lond)* 5, 269-285.
 22. Sharma, P., and Garg, S. (2010). Pure drug and polymer based nanotechnologies for the improved solubility, stability, bioavailability and targeting of anti-HIV drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 491-502.
 23. Vyas, T.K., Shah, L., and Amiji, M.M. (2006). Nanoparticulate drug carriers for delivery of HIV/AIDS therapy to viral reservoir sites. *Expert Opin Drug Deliv* 3, 613-628.
 24. Phillips, N.C., and Tsoukas, C. (1992). Liposomal encapsulation of azidothymidine results in decreased hematopoietic toxicity and enhanced activity against murine acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 79, 1137-1143.
 25. Kim, P.S., and Read, S.W. (2010). Nanotechnology and HIV: potential applications for treatment and prevention. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2, 693-702.
 26. Choi, S.U., Bui, T., and Ho, R.J. (2008). pH-dependent interactions of indinavir and lipids in nanoparticles and their ability to entrap a solute. *J Pharm Sci* 97, 931-943.
 27. Kinman, L., Brodie, S.J., Tsai, C.C., Bui, T., Larsen, K., Schmidt, A., Anderson, D., Morton, W.R., Hu, S.L., and Ho, R.J. (2003). Lipid-drug association enhanced HIV-1 protease inhibitor indinavir localization in lymphoid tissues and viral load reduction: a proof of concept study in HIV-2287-infected macaques. *J Acquir Immune Defic Syndr* 34, 387-397.

28. Dutta, T., Jain, N.K., McMillan, N.A., and Parekh, H.S. (2010). Dendrimer nanocarriers as versatile vectors in gene delivery. *Nanomedicine* 6, 25-34.
29. Takakura, Y., Nishikawa, M., Yamashita, F., and Hashida, M. (2002). Influence of physicochemical properties on pharmacokinetics of non-viral vectors for gene delivery. *J Drug Target* 10, 99-104.
30. (2010). UNAIDS REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC 2010 (http://www.unaids.org/Global_Report/Global_report.htm).
31. Cutler, B., and Justman, J. (2008). Vaginal microbicides and the prevention of HIV transmission. *Lancet Infect Dis* 8, 685-697.
32. Grant, R.M., Hamer, D., Hope, T., Johnston, R., Lange, J., Lederman, M.M., Lieberman, J., Miller, C.J., Moore, J.P., Mosier, D.E., et al. (2008). Whither or wither microbicides? *Science* 321, 532-534.
33. Garcia-Lerma, J.G., Otten, R.A., Qari, S.H., Jackson, E., Cong, M.E., Masciotra, S., Luo, W., Kim, C., Adams, D.R., Monsour, M., et al. (2008). Prevention of rectal SHIV transmission in macaques by daily or intermittent prophylaxis with emtricitabine and tenofovir. *PLoS Med* 5, e28.
34. Feldblum, P.J., Adeiga, A., Bakare, R., Wevill, S., Lendvay, A., Obadaki, F., Olayemi, M.O., Wang, L., Nanda, K., and Rountree, W. (2008). SAVVY vaginal gel (C31G) for prevention of HIV infection: a randomized controlled trial in Nigeria. *PLoS One* 3, e1474.
35. Skoler-Karpoft, S., Ramjee, G., Ahmed, K., Altini, L., Plagianos, M.G., Friedland, B., Govender, S., De Kock, A., Cassim, N., Palanee, T., et al. (2008). Efficacy of Carraguard for prevention of HIV infection in women in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 372, 1977-1987.
36. Van Damme, L., Govinden, R., Mirembe, F.M., Guedou, F., Solomon, S., Becker, M.L., Pradeep, B.S., Krishnan, A.K., Alary, M., Pande, B., et al. (2008). Lack of effectiveness of cellulose sulfate gel for the prevention of vaginal HIV transmission. *N Engl J Med* 359, 463-472.
37. Van Damme, L., Ramjee, G., Alary, M., Vuylsteke, B., Chandeying, V., Rees, H., Sirivongrangson, P., Mukenge-Tshibaka, L., Ettiegn-Traore, V., Uaheowitchai, C., et al. (2002). Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. *Lancet* 360, 971-977.
38. Chisembe, M., Crook, A., Gafos, M., Hayes, R., Jentsch, U., and Kamali, A. PRO2000 Vaginal Gel is ineffective in preventing HIV infection: results of the MDP301 Phase III Microbicide Trial. 17th Conference on Retroviruses and

- Opportunistic Infections San Francisco, California, 2010.
39. Rupp, R., Rosenthal, S.L., and Stanberry, L.R. (2007). VivaGel (SPL7013 Gel): a candidate dendrimer--microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. *Int J Nanomedicine* 2, 561-566.
 40. Dykes, G.M., Brierley, L.J., Smith, D.K., McGrail, P.T., and Seeley, G.J. (2001). Supramolecular solubilisation of hydrophilic dyes by using individual dendritic branches. *Chemistry* 7, 4730-4739.
 41. Boas, U., and Heegaard, P.M. (2004). Dendrimers in drug research. *Chem Soc Rev* 33, 43-63.
 42. Buhleier, W., and Vögtle, F. (1978). Cascade and Nonskid-chain-like Synthesis of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis* 2, 155-158.
 43. Tomalia, D.A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J., and Smith, P. (1985). A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polymer Journal* 17, 117-132.
 44. Denkewalter, Robert, Kolc, Jaroslav, Lukasavage, and William (1981). Patent US 4.289.872.
 45. De Brabrande van den Berg, E.M.M., and Meijer, E.W. (1993). Poly(propylene imine) Dendrimers: Large-Scale Synthesis by Heterogeneously Catalyzed Hydrogenations. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 32, 1308-1311.
 46. Shcharbin, D.G., Klajnert, B., and Bryszewska, M. (2009). Dendrimers in gene transfection. *Biochemistry (Mosc)* 74, 1070-1079.
 47. Majoral, J.P., and Caminade, A.M. (1999). Dendrimers containing heteroatoms (si, p, B, ge, or bi). *Chem Rev* 99, 845-880.
 48. Esfand, R., and Tomalia, D.A. (2001). Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov Today* 6, 427-436.
 49. Newkome, G.R., Yao, Z., Baker, G.R., and Gupta, V.K. (1985). Micelles. Part 1. Cascade molecules: a new approach to micelles. *A [27]-arborol. J. Org. Chem.* 50, 2003-2004.
 50. Hawker, C.J., Wooley, K.L., and Fréchet, M.J. (1993). Unimolecular micelles and globular amphiphiles dendritic macromolecules as novel recyclable solubilization agents. *J. Chem. Soc.* 1, 1287-1297.
 51. Farin, D., and Avnir, D. (1991). Surface Fractality of Dendrimers. *Angew Chem, Int Ed Engl* 30, 1379-1380.
 52. Lee, B.D.A., Wetzel, A.W., Meixner, W., and Baker, J.R. (2002). Structural Molecular Dynamic Studies on Therapeutically-Applied Polyamidoamine Dendrimers: The Effects of pH and Surface Derivatization Group. *Macromolecules* 35, 4510-4520.
 53. Chen, W., Tomalia, D.A., and Thomas, L.J. (2000). Unusual pH

- dependent polarity changes in PAMAM dendrimers: evidence for pH-responsive conformational changes *Macromolecules* **33**, 9169–9172.
54. Rebrou, E.A., Muzafarov, A.M., Papkov, U.S., and Zhdanov, A.A. (1989). Branchgrowing polysiloxanes. *Dokl Akad Nauk SSSR*, 309-376.
 55. Lambert, J.B., Pflug, J.L., and Stern, C.L. (1995). Synthesis and structure of a dendritic polysilane. *Angew. Chem. Int. Ed.* **34**, 98-99.
 56. Uchida, H., Kabe, Y., Yoshino, K., Kawamata, A., Tsumuraya, T., and Masamune, S. (1990). General Strategy for the Systematic Synthesis of Oligosiloxanes. *Silicone Dendrimers. J. Am. Chem. Soc.* **112**, 7077-7079.
 57. Van der made, A.W., and van Leeuwen, P.W.N.M. (1992). Silane dendrimers. *J.Chem.Soc*, 1400-1401.
 58. Krska, S.W., and Seyferth, D. (1998). Synthesis of water-soluble carbosilane dendrimers. *J Am Chem Soc* **120**, 3604-3612.
 59. Luhamann, B., Lang, H., and Brüning, K. (2001). *Phosph. Sulf. Silic. Relat. Element.* **168**.
 60. Kleij, A.W., Van de Coevering, R., Klein Gebbink, R.J., Noordman, A.M., Spek, A.L., and Van Koten, G. (2001). Polycationic (mixed) core-shell dendrimers for binding and delivery of inorganic/organic substrates. *Chemistry* **7**, 181-192.
 61. Schumann, H., Birgit, C., Wassermann, B.C., Schutte, S., Velder, J., Aksu, Y., Krause, W., and Radüchel, B. (2003). Synthesis and Characterization of Water-Soluble Tin-Based Metallodendrimers. *Organometallics* **22**, 2034-2048.
 62. Knapen, J.W.J., van der Made, A.W., De Wilde, J.C., Van Leeuwen, P.W.M., Wijkens, P., Grove, D.M., and Van Koten, G. (1994). Homogeneous catalysts based on silane dendrimers functionalized with arylnickel(II) complexes. *Nature* **372**, 659-663.
 63. Arévalo, S., de Jesús, E., de la Mata, F.J., Flores, J.C., Gómez, R., Gómez-Sal, M.P., Ortega, P., and Vigo, S. (2003). Synthesis of Aryloxo Cyclopentadienyl Group 4 Metal-Containing Dendrimers. *Organometallics* **22(24)**, 5109-5113.
 64. García Armada, M.P., Losada, J., Cuadrado, I., Alonso, B., González, B., Casado, C.M., and Zhang, J. (2004). Bienzyme sensors based on novel polymethylferrocenyl dendrimers *Sensor. Actuat. B-Chem.* **385**, 1209-1217.
 65. Newkome, G.R., Woosley, B.D., He, E., Moorefield, C.N., Guther, R., Baker, G.R., Escamilla, G.H., Merril, J., and Luftmann, H. (1996). Supramolecular chemistry of flexible, dendritic-based structures employing molecular recognition. *Chem. Commun.*, 2737-2738.
 66. Mori, T., Hatano, K., Matsuoka, K., Esumi, Y., Toone, E.J., and Terunuma, D. (2005). Synthesis

- of Carbosilane Dendrimers Having Peripheral Mannose and Mannobiose. *tetrahedron* **61**, 2751-2760.
67. Angurell, I., Rossell, O., and Seco, M. (2009). Synthesis of carbosilane dendrimers containing up to four metal layers. *Chemistry* **15**, 2932-2940.
68. Bermejo, J.F., Ortega, P., Chonco, L., Eritja, R., Samaniego, R., Mullner, M., de Jesus, E., de la Mata, F.J., Flores, J.C., Gomez, R., et al. (2007). Water-soluble carbosilane dendrimers: synthesis biocompatibility and complexation with oligonucleotides; evaluation for medical applications. *Chemistry* **13**, 483-495.
69. Chonco, L., Bermejo-Martin, J.F., Ortega, P., Shcharbin, D., Pedziwiatr, E., Klajnert, B., de la Mata, F.J., Eritja, R., Gomez, R., Bryszewska, M., et al. (2007). Water-soluble carbosilane dendrimers protect phosphorothioate oligonucleotides from binding to serum proteins. *Org Biomol Chem* **5**, 1886-1893.
70. Gonzalo, T., Clemente, M.I., Chonco, L., Weber, N.D., Diaz, L., Serramia, M.J., Gras, R., Ortega, P., de la Mata, F.J., Gomez, R., et al. (2010). Gene therapy in HIV-infected cells to decrease viral impact by using an alternative delivery method. *ChemMedChem* **5**, 921-929.
71. Weber, N., Ortega, P., Clemente, M.I., Shcharbin, D., Bryszewska, M., de la Mata, F.J., Gomez, R., and Munoz-Fernandez, M.A. (2008). Characterization of carbosilane dendrimers as effective carriers of siRNA to HIV-infected lymphocytes. *J Control Release* **132**, 55-64.
72. Oka, H., Onaga, T., Koyama, T., Guo, C.T., Suzuki, Y., Esumi, Y., Hatano, K., Terunuma, D., and Matsuoka, K. (2008). Sialyl alpha(2-->3) lactose clusters using carbosilane dendrimer core scaffolds as influenza hemagglutinin blockers. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 4405-4408.
73. Oka, H., Onaga, T., Koyama, T., Guo, C.T., Suzuki, Y., Esumi, Y., Hatano, K., Terunuma, D., and Matsuoka, K. (2009). Syntheses and biological evaluations of carbosilane dendrimers uniformly functionalized with sialyl alpha(2-->3) lactose moieties as inhibitors for human influenza viruses. *Bioorg Med Chem* **17**, 5465-5475.
74. Matsuoka, K., Terunuma, D., Kuzuhara, H., Suzuki, Y., Natori, Y., and Nishikawa, K. (2004). Sugar chain-containing carbosilane dendrimer compounds, process for producing the same verotoxin neutralizers and antiviral agents US Patent 2004/0040554.
75. Ortega, P., Copa-Patino, J.L., Munoz-Fernandez, M.A., Soliveri, J., Gomez, R., and de la Mata, F.J. (2008). Amine and ammonium functionalization of chloromethylsilane-ended dendrimers. Antimicrobial activity studies. *Org Biomol Chem* **6**, 3264-3269.

76. Yamada, A., Hatano, K., Matsuoka, K., Koyama, T., Esumi, Y., Koshino, H., Hino, K., Nishikawa, Natori, Y., and Terunuma, D. (2006). Syntheses and Vero toxin-binding activities of carbosilane dendrimers periphery-functionalized with galabiose *Tetrahedron Lett* 62, 5074-5083.
77. Rittner, K., Benavente, A., Bompard-Sorlet, A., Heitz, F., Divita, G., Brasseur, R., and Jacobs, E. (2002). New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol Ther* 5, 104-114.
78. El-Sayed, M., Ginski, M., Rhodes, C., and Ghandehari, H. (2002). Transepithelial transport of poly(amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers. *J Control Release* 81, 355-365.
79. Jevprasesphant, R., Penny, J., Jalal, R., Attwood, D., McKeown, N.B., and D'Emanuele, A. (2003). The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int J Pharm* 252, 263-266.
80. Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Kriegelstein, J., and Kissel, T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 24, 1121-1131.
81. Malik, N., Wiwattanapatapee, R., Klopsch, R., Lorenz, K., Frey, H., Weener, J.W., Meijer, E.W., Paulus, W., and Duncan, R. (2000). Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J Control Release* 65, 133-148.
82. Boas, U., and Heegaard, P.M.H. (2004). Dendrimers in drug research. *Chem Soc Rev* 33, 43-63.
83. Zinselmeyer, B.H., Mackay, S.P., Schatzlein, A.G., and Uchegbu, I.F. (2002). The lower-generation polypropylenimine dendrimers are effective gene-transfer agents. *Pharm Res* 19, 960-967.
84. Yoo, H., and Juliano, R.L. (2000). Enhanced delivery of antisense oligonucleotides with fluorophore-conjugated PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res* 28, 4225-4231.
85. Bielinska, A.U., Chen, C., Johnson, J., and Baker, J.R., Jr. (1999). DNA complexing with polyamidoamine dendrimers: implications for transfection. *Bioconjug Chem* 10, 843-850.
86. Shah, D.S., Sakthivel, T., Toth, I., Florence, A.T., and Wilderspin, A.F. (2000). DNA transfection and transfected cell viability using amphipathic asymmetric dendrimers. *Int J Pharm* 208, 41-48.
87. Gebhart, C.L., and Kabanov, A.V. (2001). Evaluation of polyplexes as gene transfer agents. *J Control Release* 73, 401-416.
88. Andrews, J.M., Newbound, G.C., and Lairmore, M.D. (1997). Transcriptional modulation of viral reporter gene constructs

- following induction of the cellular stress response. *Nucleic Acids Res* 25, 1082-1084.
89. Bourne, N., Stanberry, L.R., Kern, E.R., Holan, G., Matthews, B., and Bernstein, D.I. (2000). Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against herpes simplex virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2471-2474.
 90. Roberts, J.C., Bhalgat, M.K., and Zera, R.T. (1996). Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *J Biomed Mater Res* 30, 53-65.
 91. Rajanathanan, P., Attard, G.S., Sheikh, N.A., and Morrow, W.J. (1999). Evaluation of novel aggregate structures as adjuvants: composition, toxicity studies and humoral responses. *Vaccine* 17, 715-730.
 92. O. L. Padilla De Jesus, H.R.I., L. Gagne, J. M. Frechet and F. C. Szoka Jr. (2002). Polyester Dendritic Systems for Drug Delivery Applications: Design, Synthesis, and Characterization. *Bioconjugate Chem.* 13, 453-461.
 93. H. R. Ihre, D.P., F. C. Szoka and J. M. Frechet (2002). Polyester Dendritic Systems for Drug Delivery Applications: Design, Synthesis, and Characterization. *Bioconjugate Chem.* 13, 443-452.
 94. Kobayashi, H., Kawamoto, S., Saga, T., Sato, N., Hiraga, A., Ishimori, T., Konishi, J., Togashi, K., and Brechbiel, M.W. (2001). Positive effects of polyethylene glycol conjugation to generation-4 polyamidoamine dendrimers as macromolecular MR contrast agents. *Magn Reson Med* 46, 781-788.
 95. Wimmer, N., Marano, R.J., Kearns, P.S., Rakoczy, E.P., and Toth, I. (2002). Syntheses of polycationic dendrimers on lipophilic peptide core for complexation and transport of oligonucleotides. *Bioorg Med Chem Lett* 12, 2635-2637.
 96. Mannisto, M., Vanderkerken, S., Toncheva, V., Elomaa, M., Ruponen, M., Schacht, E., and Urtti, A. (2002). Structure-activity relationships of poly(L-lysines): effects of pegylation and molecular shape on physicochemical and biological properties in gene delivery. *J Control Release* 83, 169-182.
 97. Tang, M.X., Redemann, C.T., and Szoka, F.C., Jr. (1996). In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug Chem* 7, 703-714.
 98. Jansen, J.F.G.A., Meijer, E.W., and Debrabandervandenberg, E.M.M. (1995). The Dendritic Box - Shape-Selective Liberation of Encapsulated Guests. *J Am Chem Soc* 117, 4417-4418.
 99. Twyman, L.J., Esfand, R., Hardy, M.J., and Mitchell, J.C. (1999). The synthesis of water soluble dendrimers and their application as possible drug delivery systems. *Tetrahedron Lett.* 40, 1743-1746.
 100. Svenson, S., and Tomalia, D.A. (2005). Dendrimers in biomedical applications--

- reflections on the field. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 2106-2129.
101. Dennig, J. (2003). Gene transfer in eukaryotic cells using activated dendrimers. *Top Curr Chem* 228, 227-236.
102. Chauhan, A.S., Sridevi, S., Chalasani, K.B., Jain, A.K., Jain, S.K., Jain, N.K., and Diwan, P.V. (2003). Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. *J Control Release* 90, 335-343.
103. Kono, K., Liu, M., and Frechet, J.M. (1999). Design of dendritic macromolecules containing folate or methotrexate residues. *Bioconjug Chem* 10, 1115-1121.
104. Quintana, A., Raczka, E., Piehler, L., Lee, I., Myc, A., Majoros, I., Patri, A.K., Thomas, T., Mule, J., and Baker, J.R., Jr. (2002). Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor. *Pharm Res* 19, 1310-1316.
105. Shukla, S., Wu, G., Chatterjee, M., Yang, W., Sekido, M., Diop, L.A., Muller, R., Sudimack, J.J., Lee, R.J., Barth, R.F., et al. (2003). Synthesis and biological evaluation of folate receptor-targeted boronated PAMAM dendrimers as potential agents for neutron capture therapy. *Bioconjug Chem* 14, 158-167.
106. Malik, N., Evagorou, E.G., and Duncan, R. (1999). Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs* 10, 767-776.
107. du Toit, L.C., Pillay, V., and Choonara, Y.E. (2011). Nanomicrobicides: challenges in drug delivery, patient ethics and intellectual property in the war against HIV/AIDS. *Adv Drug Deliv Rev* 62, 532-546.
108. Gajbhiye, V., Palanirajan, V.K., Tekade, R.K., and Jain, N.K. (2009). Dendrimers as therapeutic agents: a systematic review. *J Pharm Pharmacol* 61, 989-1003.
109. Gong, Y., Matthews, B., Cheung, D., Tam, T., Gadawski, I., Leung, D., Holan, G., Raff, J., and Sacks, S. (2002). Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication. *Antiviral Res* 55, 319-329.
110. Witvrouw, M., Fikkert, V., Pluymers, W., Matthews, B., Mardel, K., Schols, D., Raff, J., Debyser, Z., De Clercq, E., Holan, G., et al. (2000). Polyanionic (i.e., polysulfonate) dendrimers can inhibit the replication of human immunodeficiency virus by interfering with both virus adsorption and later steps (reverse transcriptase/integrase) in the virus replicative cycle. *Mol Pharmacol* 58, 1100-1108.
111. Witvrouw, M., Weigold, H., Pannecouque, C., Schols, D., De Clercq, E., and Holan, G. (2000). Potent anti-HIV (type 1 and type 2) activity of polyoxometalates: structure-activity relationship and mechanism of action. *J Med Chem* 43, 778-783.

112. Kensinger, R.D., Catalone, B.J., Krebs, F.C., Wigdahl, B., and Schengrund, C.L. (2004). Novel polysulfated galactose-derivatized dendrimers as binding antagonists of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1614-1623.
113. Barnard, D.L., Sidwell, R.W., Gage, T.L., Okleberry, K.M., Matthews, B., and Holan, G. (1997). Anti-respiratory syncytial virus activity of dendrimer polyanions. *Antiviral Res.* 34, 88-88.
114. Wang, Q.C., Feng, Z.H., Nie, Q.H., and Zhou, Y.X. (2004). DC-SIGN: binding receptors for hepatitis C virus. *Chin Med J (Engl)* 117, 1395-1400.
115. van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 3, 697-709.
116. Rosa Borges, A., and Schengrund, C.L. (2005). Dendrimers and antivirals: a review. *Curr Drug Targets Infect Disord* 5, 247-254.
117. Lasala, F., Arce, E., Otero, J.R., Rojo, J., and Delgado, R. (2003). Mannosyl glycodendritic structure inhibits DC-SIGN-mediated Ebola virus infection in cis and in trans. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 3970-3972.
118. Landers, J.J., Cao, Z., Lee, I., Piehler, L.T., Myc, P.P., Myc, A., Hamouda, T., Galecki, A.T., and Baker, J.R., Jr. (2002). Prevention of influenza pneumonitis by sialic Acid-conjugated dendritic polymers. *J Infect Dis* 186, 1222-1230.
119. Rele, S.M., Cui, W., Wang, L., Hou, S., Barr-Zarse, G., Tatton, D., Gnanou, Y., Esko, J.D., and Chaikof, E.L. (2005). Dendrimer-like PEO glycopolymers exhibit anti-inflammatory properties. *J Am Chem Soc* 127, 10132-10133.
120. Turk, H., Haag, R., and Alban, S. (2004). Dendritic polyglycerol sulfates as new heparin analogues and potent inhibitors of the complement system. *Bioconjug Chem* 15, 162-167.
121. Alban, S., Kraus, J., and Franz, G. (1992). Synthesis of laminarin sulfates with anticoagulant activity. *Arzneimittelforschung* 42, 1005-1008.
122. Gait, M.J., Jones, A.S., and Walker, R.T. (1974). Synthetic-analogues of polynucleotides XII. Synthesis of thymidine derivatives containing an oxyacetamido- or an oxyformamido-linkage instead of a phosphodiester group. *J Chem Soc Perkin 1* 0, 1684-1686.
123. Chen, C.Z., Beck-Tan, N.C., Dhurjati, P., van Dyk, T.K., LaRossa, R.A., and Cooper, S.L. (2000). Quaternary ammonium functionalized poly(propylene imine) dendrimers as effective antimicrobials: structure-activity studies. *Biomacromolecules* 1, 473-480.
124. Chen, C.Z., and Cooper, S.L. (2002). Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes. *Biomaterials* 23, 3359-3368.

125. Tulu, M., Aghatabay, N.M., Senel, M., Dizman, C., Parali, T., and Dulger, B. (2009). Synthesis, characterization and antimicrobial activity of water soluble dendritic macromolecules. *Eur J Med Chem* 44, 1093-1099.
126. Battah, S.H., Chee, C.E., Nakanishi, H., Gerscher, S., MacRobert, A.J., and Edwards, C. (2001). Synthesis and biological studies of 5-aminolevulinic acid-containing dendrimers for photodynamic therapy. *Bioconjug Chem* 12, 980-988.
127. Nishiyama, N., Stapert, H.R., Zhang, G.D., Takasu, D., Jiang, D.L., Nagano, T., Aida, T., and Kataoka, K. (2003). Light-harvesting ionic dendrimer porphyrins as new photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioconjug Chem* 14, 58-66.
128. Neerman, M.F., Chen, H.T., Parrish, A.R., and Simanek, E.E. (2004). Reduction of drug toxicity using dendrimers based on melamine. *Mol Pharm* 1, 390-393.
129. Supattapone, S., Nishina, K., and Rees, J.R. (2002). Pharmacological approaches to prion research. *Biochem Pharmacol* 63, 1383-1388.
130. Klajnert, B., Cortijo-Arellano, M., Cladera, J., and Bryszewska, M. (2006). Influence of dendrimer's structure on its activity against amyloid fibril formation. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 21-28.
131. Van Regenmortel, M.H., Briand, J.P., Muller, S., and Plaue, S. (1988). *Synthetic Polypeptides as Antigens*. Elsevier, Amsterdam.
132. Sadler, K., and Tam, J.P. (2002). Peptide dendrimers: applications and synthesis. *J Biotechnol* 90, 195-229.
133. Spetzler, J.C., and Tam, J.P. (1996). Self-assembly of cyclic peptides on a dendrimer: multiple cyclic antigen peptides. *Pept Res* 9, 290-296.
134. De Oliveira, E., Villen, J., Giralt, E., and Andreu, D. (2003). Synthetic approaches to multivalent lipopeptide dendrimers containing cyclic disulfide epitopes of foot-and-mouth disease virus. *Bioconjug Chem* 14, 144-152.
135. Nardin, E.H., Calvo-Calle, J.M., Oliveira, G.A., Nussenzweig, R.S., Schneider, M., Tiercy, J.M., Loutan, L., Hochstrasser, D., and Rose, K. (2001). A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing Plasmodium falciparum B cell and universal T cell epitopes elicits immune responses in volunteers of diverse HLA types. *J Immunol* 166, 481-489.
136. Nardin, E.H., Oliveira, G.A., Calvo-Calle, J.M., Castro, Z.R., Nussenzweig, R.S., Schmeckpeper, B., Hall, B.F., Diggs, C., Bodison, S., and Edelman, R. (2000). Synthetic malaria peptide vaccine elicits high levels of antibodies in vaccinees of defined HLA genotypes. *J Infect Dis* 182, 1486-1496.

137. Moreno, C.A., Rodriguez, R., Oliveira, G.A., Ferreira, V., Nussenzweig, R.S., Moya Castro, Z.R., Calvo-Calle, J.M., and Nardin, E. (1999). Preclinical evaluation of a synthetic Plasmodium falciparum MAP malaria vaccine in Aotus monkeys and mice. *Vaccine* 18, 89-99.
138. Ota, S., Ono, T., Morita, A., Uenaka, A., Harada, M., and Nakayama, E. (2002). Cellular processing of a multibranched lysine core with tumor antigen peptides and presentation of peptide epitopes recognized by cytotoxic T lymphocytes on antigen-presenting cells. *Cancer Res* 62, 1471-1476.
139. Bay, S., Lo-Man, R., Osinaga, E., Nakada, H., Leclerc, C., and Cantacuzene, D. (1997). Preparation of a multiple antigen glycopeptide (MAG) carrying the Tn antigen. A possible approach to a synthetic carbohydrate vaccine. *J Pept Res* 49, 620-625.
140. Zhang, Y., Li, Z., Thonar, E.J., An, H.S., He, T.C., Pietryla, D., and Phillips, F.M. (2005). Transduced bovine articular chondrocytes affect the metabolism of cocultured nucleus pulposus cells in vitro: implications for chondrocyte transplantation into the intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 30, 2601-2607.
141. Khew, S.T., Yang, Q.J., and Tong, Y.W. (2008). Enzymatically crosslinked collagen-mimetic dendrimers that promote integrin-targeted cell adhesion. *Biomaterials* 29, 3034-3045.
142. Kinberger, G.A., Cai, W., and Goodman, M. (2002). Collagen mimetic dendrimers. *J Am Chem Soc* 124, 15162-15163.
143. (2010). OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS (www.oepm.es).
144. Dear, J.W., Kobayashi, H., Jo, S.K., Holly, M.K., Hu, X., Yuen, P.S., Brechbiel, M.W., and Star, R.A. (2005). Dendrimer-enhanced MRI as a diagnostic and prognostic biomarker of sepsis-induced acute renal failure in aged mice. *Kidney Int* 67, 2159-2167.
145. Myc, A., Douce, T.B., Ahuja, N., Kotlyar, A., Kukowska-Latallo, J., Thomas, T.P., and Baker, J.R., Jr. (2008). Preclinical antitumor efficacy evaluation of dendrimer-based methotrexate conjugates. *Anticancer Drugs* 19, 143-149.
146. Hogrefe, R.I. (1999). An antisense oligonucleotide primer. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 9, 351-357.
147. Tavitian, B. (2000). In vivo antisense imaging. *Q J Nucl Med* 44, 236-255.
148. Agrawal S, T.J., Brown DM. (1990). Analytical study of phosphorothioate analogues of oligodeoxynucleotides using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 509, 396-399.
149. DeLong, R.K., Nolting, A., Fisher, M., Chen, Q., Wickstrom, E., Kligshiteyn, M., Demirdji, S., Caruthers, M., and Juliano, R.L. (1997). Comparative

- pharmacokinetics, tissue distribution, and tumor accumulation of phosphorothioate, phosphorodithioate, and methylphosphonate oligonucleotides in nude mice. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7, 71-77.
150. Larrouy, B., Blonski, C., Boiziau, C., Stuer, M., Moreau, S., Shire, D., and Toulme, J.J. (1992). RNase H-mediated inhibition of translation by antisense oligodeoxyribonucleotides: use of backbone modification to improve specificity. *Gene* 121, 189-194.
 151. Agrawal, S., Zhang, X., Lu, Z., Zhao, H., Tamburin, J.M., Yan, J., Cai, H., Diasio, R.B., Habus, I., Jiang, Z., et al. (1995). Absorption, tissue distribution and in vivo stability in rats of a hybrid antisense oligonucleotide following oral administration. *Biochem Pharmacol* 50, 571-576.
 152. Monia, B.P., Lesnik, E.A., Gonzalez, C., Lima, W.F., McGee, D., Guinasso, C.J., Kawasaki, A.M., Cook, P.D., and Freier, S.M. (1993). Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J Biol Chem* 268, 14514-14522.
 153. Nielsen, P.E., Egholm, M., and Buchardt, O. (1994). Peptide nucleic acid (PNA). A DNA mimic with a peptide backbone. *Bioconjug Chem* 5, 3-7.
 154. Hnatowich, D.J. (1999). Changing focus: applying antisense to nuclear medicine imaging. *Mol Med Today* 5, 151.
 155. Stephenson, M.L., and Zamecnik, P.C. (1978). Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 285-288.
 156. Lebleu, B., Clarenc, J.P., Degols, G., Leonetti, J.P., and Milhaud, P. (1992). [Control of gene expression by antisense nucleic acids]. *C R Seances Soc Biol Fil* 186, 560-566.
 157. Stein, C.A., and Cheng, Y.C. (1993). Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical? *Science* 261, 1004-1012.
 158. (2010). Clinical trials (<http://clinicaltrials.gov>).
 159. Geary, R.S., Henry, S.P., and Grillone, L.R. (2002). Fomivirsen: clinical pharmacology and potential drug interactions. *Clin Pharmacokinet* 41, 255-260.
 160. Stein, C.A. (1999). Keeping the biotechnology of antisense in context. *Nat Biotechnol* 17, 209.
 161. Benimetskaya, L., Tonkinson, J.L., Koziolkiewicz, M., Karwowski, B., Guga, P., Zeltser, R., Stec, W., and Stein, C.A. (1995). Binding of phosphorothioate oligodeoxynucleotides to basic fibroblast growth factor, recombinant soluble CD4, laminin and fibronectin is P-chirality independent. *Nucleic Acids Res* 23, 4239-4245.
 162. Srinivasan, S.K., Tewary, H.K., and Iversen, P.L. (1995).

- Characterization of binding sites, extent of binding, and drug interactions of oligonucleotides with albumin. *Antisense Res Dev* 5, 131-139.
163. Henry, S.P., Novotny, W., Leeds, J., Auletta, C., and Kornbrust, D.J. (1997). Inhibition of coagulation by a phosphorothioate oligonucleotide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7, 503-510.
 164. Geselowitz, D.A., and Neckers, L.M. (1995). Bovine serum albumin is a major oligonucleotide-binding protein found on the surface of cultured cells. *Antisense Res Dev* 5, 213-217.
 165. Yakubov, L.A., Deeva, E.A., Zarytova, V.F., Ivanova, E.M., Ryte, A.S., Yurchenko, L.V., and Vlassov, V.V. (1989). Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6454-6458.
 166. Hawley, P., and Gibson, I. (1996). Interaction of oligodeoxynucleotides with mammalian cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6, 185-195.
 167. Prochiantz, A. (1998). Peptide nucleic acid smugglers. *Nat Biotechnol* 16, 819-820.
 168. Felgner, P.L., Barenholz, Y., Behr, J.P., Cheng, S.H., Cullis, P., Huang, L., Jessee, J.A., Seymour, L., Szoka, F., Thierry, A.R., et al. (1997). Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum Gene Ther* 8, 511-512.
 169. Tavitian, B., Marzabal, S., Boutet, V., Kuhnast, B., Terrazzino, S., Moynier, M., Dolle, F., Deverre, J.R., and Thierry, A.R. (2002). Characterization of a synthetic anionic vector for oligonucleotide delivery using in vivo whole body dynamic imaging. *Pharm Res* 19, 367-376.
 170. Sedelnikova, O.A., Karamychev, V.N., Panyutin, I.G., and Neumann, R.D. (2002). Sequence-specific gene cleavage in intact mammalian cells by 125I-labeled triplex-forming oligonucleotides conjugated with nuclear localization signal peptide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 12, 43-49.
 171. Helene, C. (1991). The anti-gene strategy: control of gene expression by triplex-forming-oligonucleotides. *Anticancer Drug Des* 6, 569-584.
 172. Sethi, S., Lipford, G., Wagner, H., and Kretzschmar, H. (2002). Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet* 360, 229-230.
 173. Vollmer, J., Rankin, R., Hartmann, H., Jurk, M., Samulowitz, U., Wader, T., Janosch, A., Schetter, C., and Krieg, A.M. (2004). Immunopharmacology of CpG oligodeoxynucleotides and ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 2314-2317.
 174. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent

- and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
175. Cerutti, H. (2003). RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends Genet* 19, 39-46.
 176. Galvez, T., Teruel, M.N., Heo, W.D., Jones, J.T., Kim, M.L., Liou, J., Myers, J.W., and Meyer, T. (2007). siRNA screen of the human signaling proteome identifies the PtdIns(3,4,5)P3-mTOR signaling pathway as a primary regulator of transferrin uptake. *Genome Biol* 8, R142.
 177. Coburn, G.A., and Cullen, B.R. (2002). Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol* 76, 9225-9231.
 178. Martinez, M.A., Gutierrez, A., Armand-Ugon, M., Blanco, J., Parera, M., Gomez, J., Clotet, B., and Este, J.A. (2002). Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication. *AIDS* 16, 2385-2390.
 179. Novina, C.D., Murray, M.F., Dykxhoorn, D.M., Beresford, P.J., Riess, J., Lee, S.K., Collman, R.G., Lieberman, J., Shankar, P., and Sharp, P.A. (2002). siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 8, 681-686.
 180. Shukla, S., Sumaria, C.S., and Pradeepkumar, P.I. (2010). Exploring chemical modifications for siRNA therapeutics: a structural and functional outlook. *ChemMedChem* 5, 328-349.
 181. Chonco, L., De la Mata, F.J., Bermejo, J.F., Flores, J.C., De Jesus, E., Serramía, M.J., Fernández, G., Gomez, R., Ortega, P., and Munoz-Fernandez, A. (2005). Nuevos dendrímeros carbosilanos, su preparación y sus usos. OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS, 200501810
 182. Chonco, L., De la Mata, F.J., Sanchez-nieves, J., Ortega, P., Gomez, R., Munoz-Fernandez, A., and Serramía, M.J. (2010). Dendrímeros carbosilano con un nucleo polifenólico y su uso como antivirales. OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS, 201030450.
 183. Chonco, L., De la Mata, F.J., Sanchez-nieves, J., Rasines, B., Arnaiz, E., Serramía, M.J., Gomez, R., and Munoz-Fernandez, A. (2010). Dendrímeros carbosilano y su uso como antivirales. OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS, 201030233.
 184. Sato, N., Kobayashi, H., Saga, T., Nakamoto, Y., Ishimori, T., Togashi, K., Fujibayashi, Y., Konishi, J., and Brechbiel, M.W. (2001). Tumor targeting and imaging of intraperitoneal tumors by use of antisense oligo-DNA complexed with dendrimers and/or avidin in mice. *Clin Cancer Res* 7, 3606-3612.
 185. Klajnert, B., and Bryszewska, M. (2002). Fluorescence studies on PAMAM dendrimers

- interactions with bovine serum albumin. *Bioelectrochemistry* 55, 33-35.
186. Klajnert, B., Stanislawski, L., Bryszewska, M., and Palecz, B. (2003). Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 1648, 115-126.
 187. Shcharbin, D., Klajnert, B., and Bryszewska, M. (2005). The effect of PAMAM dendrimers on human and bovine serum albumin at different pH and NaCl concentrations. *J Biomater Sci Polym Ed* 16, 1081-1093.
 188. Pedziwiatr, E., Shcharbin, D., Chonco, L., Ortega, P., de la Mata, F.J., Gomez, R., Klajnert, B., Bryszewska, M., and Munoz-Fernandez, M.A. (2009). Binding properties of water-soluble carbosilane dendrimers. *J Fluoresc* 19, 267-275.
 189. Shcharbin, D., Klajnert, B., Mazhul, V., and Bryszewska, M. (2005). Dendrimer interactions with hydrophobic fluorescent probes and human serum albumin. *J Fluoresc* 15, 21-28.
 190. Tobiume, M., Takahoko, M., Tatsumi, M., and Matsuda, M. (2001). Establishment of a MAGI-derived indicator cell line that detects the Nef enhancement of HIV-1 infectivity with high sensitivity. *J Virol Methods* 97, 151-158.
 191. Yahi, N., Sabatier, J.M., Nickel, P., Mabrouk, K., Gonzalez-Scarano, F., and Fantini, J. (1994). Suramin inhibits binding of the V3 region of HIV-1 envelope glycoprotein gp120 to galactosylceramide, the receptor for HIV-1 gp120 on human colon epithelial cells. *J Biol Chem* 269, 24349-24353.
 192. Martin, A., Aguirre, J., Sarasa-Renedo, A., Tsoukatou, D., Garofalakis, A., Meyer, H., Mamalaki, C., Ripoll, J., and Planas, A.M. (2008). Imaging changes in lymphoid organs in vivo after brain ischemia with three-dimensional fluorescence molecular tomography in transgenic mice expressing green fluorescent protein in T lymphocytes. *Mol Imaging* 7, 157-167.
 193. Carter, D., and Ho, X.J. (1994). Structure of serum albumins. *Adv Protein Chem* 45, 153-203.
 194. Schubert, S., and Kurreck, J. (2006). Oligonucleotide-based antiviral strategies. *Handb Exp Pharmacol*, 261-287.
 195. Krieg, A.M., Gmelig-Meyling, F., Gourley, M.F., Kisch, W.J., Chrisey, L.A., and Steinberg, A.D. (1991). Uptake of oligodeoxyribonucleotides by lymphoid cells is heterogeneous and inducible. *Antisense Res Dev* 1, 161-171.
 196. Merkel, O.M., Mintzer, M.A., Librizzi, D., Samsonova, O., Dicke, T., Sproat, B., Garn, H., Barth, P.J., Simanek, E.E., and Kissel, T. (2010). Triazine dendrimers as nonviral vectors for in vitro and in vivo RNAi: the effects of peripheral groups and core structure on biological activity. *Mol Pharm* 7, 969-983.
 197. Hladik, F., and Hope, T.J. (2009). HIV infection of the genital mucosa in women. *Curr HIV/AIDS Rep* 6, 20-28.

198. Gali, Y., Arien, K.K., Praet, M., Van den Bergh, R., Temmerman, M., Delezay, O., and Vanham, G. (2010). Development of an in vitro dual-chamber model of the female genital tract as a screening tool for epithelial toxicity. *J Virol Methods* 165, 186-197.
199. Mulligan, R.C. (1993). The basic science of gene therapy. *Science* 260, 926-932.
200. Ruponen, M., Honkakoski, P., Ronkko, S., Pelkonen, J., Tammi, M., and Urtti, A. (2003). Extracellular and intracellular barriers in non-viral gene delivery. *J Control Release* 93, 213-217.
201. Adjei, A.A., Dy, G.K., Erlichman, C., Reid, J.M., Sloan, J.A., Pitot, H.C., Alberts, S.R., Goldberg, R.M., Hanson, L.J., Atherton, P.J., et al. (2003). A phase I trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, in combination with gemcitabine in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 9, 115-123.
202. Kukowska-Latallo, J.F., Bielinska, A.U., Johnson, J., Spindler, R., Tomalia, D.A., and Baker, J.R., Jr. (1996). Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4897-4902.
203. Shcharbin, D., Pedziwiatr, E., and Bryszewska, M. (2009). How to study dendriplexes I: Characterization. *J Control Release* 135, 186-197.
204. Greig, M., Cummins, L., Sasmor, H., and Griffey, R. (1995). Measurement of macromolecular binding using electrospray mass spectrometry. Determination of disassociation constants for oligonucleotide-serum albumin complexes. *J Am Chem Soc* 117, 10765-10766.
205. Shcharbin, D., Janicka, M., Wasiak, M., Palecz, B., Przybyszewska, M., Zaborski, M., and Bryszewska, M. (2007). Serum albumins have five sites for binding of cationic dendrimers. *Biochim Biophys Acta* 1774, 946-951.
206. Ottaviani, M.F., Jockusch, S., Turro, N.J., Tomalia, D.A., and Barbon, A. (2004). Interactions of dendrimers with selected amino acids and proteins studied by continuous wave EPR and Fourier transform EPR. *Langmuir* 20, 10238-10245.
207. Vlckova, M., and Schwarz, M.A. (2007). Determination of cationic neurotransmitters and metabolites in brain homogenates by microchip electrophoresis and carbon nanotube-modified amperometry. *J Chromatogr A* 1142, 214-221.
208. Catalanotti, B., Galeone, A., Gomez-Paloma, L., Mayol, L., and Pepe, A. (2000). 2'-Deoxy-8-(propyn-1-yl)adenosine-containing oligonucleotides: effects on stability of duplex and quadruplex structures. *Bioorg Med Chem Lett* 10, 2005-2009.

209. Slavik, J. (1982). Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim Biophys Acta* 694, 1-25.
210. Radda, G.K. (1972). Fluorescent probes in membrane studies. *Biomembranes* 3, 247-266.
211. Matulis, D., Baumann, C.G., Bloomfield, V.A., and Lovrien, R.E. (1999). 1-anilino-8-naphthalene sulfonate as a protein conformational tightening agent. *Biopolymers* 49, 451-458.
212. Klajnert, B., Walach, W., Bryszewska, M., Dworak, A., and Shcharbin, D. (2006). Cytotoxicity, haematotoxicity and genotoxicity of high molecular mass arborescent polyoxyethylene polymers with polyglycidol-block-containing shells. *Cell Biol Int* 30, 248-252.
213. Chen, W., Turro, N.J., and Tomalia, D. (2000). Using Ethidium Bromide To Probe the Interactions between DNA and Dendrimers. *Langmuir* 16, 15-19.
214. Peters, T. (1996). All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications. Academic Press.
215. Pedziwiatr, E., Shcharbin, D., Maly, J., Maly, M., Zaborski, M., Gabara, B., Ortega, P., De la mata, F., Gomez, R., Munoz-Fernandez, M.A., et al. (2011). Carbosilane dendrimers as a non-viral delivery system for antisense oligonucleotides. Characterization of dendriplexes. *Manuscript in preparation*.
216. Dufes, C., Uchegbu, I.F., and Schatzlein, A.G. (2005). Dendrimers in gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 2177-2202.
217. Shcharbin, D., Pedziwiatr, E., Nowacka, O., Kumar, M., Zaborski, M., Ortega, P., Javier de la Mata, F., Gomez, R., Munoz-Fernandez, M.A., and Bryszewska, M. (2011). Carbosilane dendrimers NN8 and NN16 form a stable complex with siGAG1. *Colloids Surf B Biointerfaces*.
218. Ackermann, B., Engel, B.C., Buttlies, B., Zibert, A., and Burdach, S. (2002). Transgenic IL-2 expression in Ewing tumor cell lines after transfection with Starburst dendrimers and cationic liposomes. *Pediatr Hematol Oncol* 19, 509-520.
219. Domański, D.M., Bryszewska, M., and Leyko, W. (1999). Book of Abstracts p. 63, s.l.D. Symposium, Editor. 1999: Frankfurt/Main.
220. Nakai, D., Seita, T., Terasaki, T., Iwasa, S., Shoji, Y., Mizushima, Y., and Sugiyama, Y. (1996). Cellular uptake mechanism for oligonucleotides: involvement of endocytosis in the uptake of phosphodiester oligonucleotides by a human colorectal adenocarcinoma cell line, HCT-15. *J Pharmacol Exp Ther* 278, 1362-1372.
221. Zhao, Y., Zheng, Z., Robbins, P.F., Khong, H.T., Rosenberg, S.A., and Morgan, R.A. (2005). Primary human lymphocytes transduced with NY-ESO-1 antigen-specific TCR genes

- recognize and kill diverse human tumor cell lines. *J Immunol* 174, 4415-4423.
222. Lavigne, C., Yelle, J., Sauve, G., and Thierry, A.R. (2002). Is antisense an appropriate nomenclature or design for oligodeoxynucleotides aimed at the inhibition of HIV-1 replication? *AAPS PharmSci* 4, E9.
 223. Pion, M., Serramia, M.J., Diaz, L., Bryszewska, M., Gallart, T., Garcia, F., Gomez, R., de la Mata, F.J., and Munoz-Fernandez, M.A. (2011). Phenotype and functional analysis of human monocytes-derived dendritic cells loaded with a carbosilane dendrimer. *Biomaterials* 31, 8749-8758.
 224. Hudecz, F., Clegg, J.A., Kajtar, J., Embleton, M.J., Pimm, M.V., Szekerke, M., and Baldwin, R.W. (1993). Influence of carrier on biodistribution and in vitro cytotoxicity of methotrexate-branched polypeptide conjugates. *Bioconjug Chem* 4, 25-33.
 225. Rolland, O., Griffe, L., Poupot, M., Maraval, A., Ouali, A., Coppel, Y., Fournie, J.J., Bacquet, G., Turrin, C.O., Caminade, A.M., et al. (2008). Tailored control and optimisation of the number of phosphonic acid termini on phosphorus-containing dendrimers for the ex-vivo activation of human monocytes. *Chemistry* 14, 4836-4850.
 226. McGowan, I. (2010). Microbicides for HIV prevention: reality or hope? *Curr Opin Infect Dis* 23, 26-31.
 227. Berlier, W., Bourlet, T., Lawrence, P., Hamzeh, H., Lambert, C., Genin, C., Verrier, B., Dieu-Nosjean, M.C., Pozzetto, B., and Delezay, O. (2005). Selective sequestration of X4 isolates by human genital epithelial cells: Implication for virus tropism selection process during sexual transmission of HIV. *J Med Virol* 77, 465-474.
 228. Scordi-Bello, I.A., Mosoian, A., He, C., Chen, Y., Cheng, Y., Jarvis, G.A., Keller, M.J., Hogarty, K., Waller, D.P., Profy, A.T., et al. (2005). Candidate sulfonated and sulfated topical microbicides: comparison of anti-human immunodeficiency virus activities and mechanisms of action. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 3607-3615.
 229. Miller, C.J., and Shattock, R.J. (2003). Target cells in vaginal HIV transmission. *Microbes Infect* 5, 59-67.
 230. Dittmar, M.T., Simmons, G., Donaldson, Y., Simmonds, P., Clapham, P.R., Schulz, T.F., and Weiss, R.A. (1997). Biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 clones derived from different organs of an AIDS patient by long-range PCR. *J Virol* 71, 5140-5147.
 231. Maly, M., Sedlak, D., Stryhal, Z., Posel, Z., Petrus, P., Maiolo, M., Danani, A., De la Mata, F.J., Gómez, R., and Muñoz-Fernandez, M.A. (2010). ANIONIC CARBOSILANE DENDRIMERS AS THE

- POTENTIAL ANTI-HIV AGENTS: COMPUTATIONAL STUDY OF DENDRIMER-Gp120 INTERACTION. 2nd International Symposium on Biological Applications of Dendrimers. Porquerolles, France.
232. Saidi, H., Magri, G., Nasreddine, N., Requena, M., and Belec, L. (2007). R5- and X4-HIV-1 use differentially the endometrial epithelial cells HEC-1A to ensure their own spread: implication for mechanisms of sexual transmission. *Virology* 358, 55-68.
 233. Nazli, A., Chan, O., Dobson-Belaire, W.N., Ouellet, M., Tremblay, M.J., Gray-Owen, S.D., Arsenault, A.L., and Kaushic, C. (2010). Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog* 6, e1000852.
 234. Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., et al. (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587-597.
 235. Jaeger, S., Ertaylan, G., van Dijk, D., Leser, U., and Sloot, P. (2010). Inference of surface membrane factors of HIV-1 infection through functional interaction networks. *PLoS One* 5, e13139.
 236. Izmailova, E., Bertley, F.M., Huang, Q., Makori, N., Miller, C.J., Young, R.A., and Aldovini, A. (2003). HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages. *Nat Med* 9, 191-197.
 237. Granelli-Piperno, A., Delgado, E., Finkel, V., Paxton, W., and Steinman, R.M. (1998). Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol* 72, 2733-2737.
 238. Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Mitsuki, Y.Y., Mizukoshi, F., Tsuchiya, T., Terahara, K., Inagaki, Y., Yamamoto, N., Kobayashi, K., and Inoue, J. (2009). Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. *PLoS Pathog* 5, e1000279.
 239. Shattock, R.J., and Doms, R.W. (2002). AIDS models: microbicides could learn from vaccines. *Nat Med* 8, 425.
 240. Bosch, B., Grigorov, B., Senserrich, J., Clotet, B., Darlix, J.L., Muriaux, D., and Este, J.A. (2008). A clathrin-dynamin-dependent endocytic pathway for the uptake of HIV-1 by direct T cell-T cell transmission. *Antiviral Res* 80, 185-193.
 241. Izquierdo-Useros, N., Naranjo-Gomez, M., Archer, J., Hatch, S.C., Erkizia, I., Blanco, J.,

- Borras, F.E., Puertas, M.C., Connor, J.H., Fernandez-Figueras, M.T., et al. (2009). Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood* 113, 2732-2741.
242. Huskens, D., Vermeire, K., Profy, A.T., and Schols, D. (2009). The candidate sulfonated microbicide, PRO 2000, has potential multiple mechanisms of action against HIV-1. *Antiviral Res* 84, 38-47.
243. Mesquita, P.M., Cheshenko, N., Wilson, S.S., Mhatre, M., Guzman, E., Fakioglu, E., Keller, M.J., and Herold, B.C. (2009). Disruption of tight junctions by cellulose sulfate facilitates HIV infection: model of microbicide safety. *J Infect Dis* 200, 599-608.
244. Shaunak, S., Thomas, S., Gianasi, E., Godwin, A., Jones, E., Teo, I., Mireskandari, K., Luthert, P., Duncan, R., Patterson, S., et al. (2004). Polyvalent dendrimer glucosamine conjugates prevent scar tissue formation. *Nat Biotechnol* 22, 977-984.
245. Vannucci, L., Fiserova, A., Sadalapure, K., Lindhorst, T.K., Kuldova, M., Rossmann, P., Horvath, O., Kren, V., Krist, P., Bezouska, K., et al. (2003). Effects of N-acetyl-glucosamine-coated glycodendrimers as biological modulators in the B16F10 melanoma model in vivo. *Int J Oncol* 23, 285-296.
246. Sonza, S., Johnson, A., Tyssen, D., Spelman, T., Lewis, G.R., Paull, J.R., and Tachedjian, G. (2009). Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 replication is not intrinsic to all polyanion-based microbicides. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 3565-3568.
247. Tao, W., Richards, C., and Hamer, D. (2008). Enhancement of HIV infection by cellulose sulfate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24, 925-929.
248. Huskens, D., Vermeire, K., Vandemeulebroucke, E., Balzarini, J., and Schols, D. (2008). Safety concerns for the potential use of cyanovirin-N as a microbicidal anti-HIV agent. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 2802-2814.
249. Saidi, H., Jenabian, M.A., Gombert, B., Charpentier, C., Mannarini, A., and Belec, L. (2008). Pre-clinical development as microbicide of zinc tetra-ascorbo-camphorate, a novel terpenoid derivative: potent in vitro inhibitory activity against both R5- and X4-tropic HIV-1 strains without significant in vivo mucosal toxicity. *AIDS Res Ther* 5, 10.
250. Keller, M.J., Mesquita, P.M., Torres, N.M., Cho, S., Shust, G., Madan, R.P., Cohen, H.W., Petrie, J., Ford, T., Soto-Torres, L., et al. (2010). Postcoital bioavailability and antiviral activity of 0.5% PRO 2000 gel: implications for future microbicide clinical trials. *PLoS One* 5, e8781.